

表 1 : 検討 1 で使用した 4 社の LDL-C および HDL-C 直接法の試薬

会 社	LDL-C の試薬名	HDL-C の試薬名
デンカ生研	LDL-EX	HDL-EX
和光	L タイプワコー LDL-C・M	L タイプワコー HDL-C・M
協和メデックス	メタボリード LDL-C	メタボリード HDL-C
積水メディカル	コレテスト LDL	コレテスト N HDL

C. 研究結果

a) 検討 1

2 施設において、合計で 183 人からサンプルを採取した。TG 値は、最大値が 1,518 mg/dL、最小値は 31 mg/dL であった。解析対象となる TG が 1,000 mg/dL 未満の検体は

180 例で、前回の検体数と合わせると 353 例となった。また、LDL-C 直接法の正確性に試薬間の性能の差が大きかった 400 mg/dL 以上の高 TG 血症の検体は 10 例 (5.6%) を占めた (表 2)

表 2 : 対象者の TG 値の分布の比較

	Miller らの検討 (n=175) ^{1, 2)}	前回の検討 (n=173) ³⁾	今回の検討 (n=180)	合 計 (n=353)
健常群/疾患群	37/138	49/124	未確定	未確定
TG 値 (mg/dL)				
>1,000	3	(5) 除外	(3) 除外予定	(8) 除外予定
999~600	1	9	3	12
559~400	3	8	7	15
399~200	21	29	39	68
199~ 0	146+1? ⁴⁾	127	131	258

1) Miller WG. et al. Clin Chem 56: 977-86. 2010

2) van Deventer HE. et al. Clin Chem 56: 977-86. 2011

3) Miida T. et al. Atherosclerosis 225: 208-15. 2012

4) どこに分類されるか不明な検体数

次に、採取した検体の LDL-C 値の分布を同様に調べた (表 3)。LDL-C が 300 mg/dL 以上の高度な高 LDL-C 血症の検体は認めなかった。しかし、家族性高コレステロール血症のヘテロ型の典型例に認められる 200~299 mg/dL の高 LDL-C 血症検体は、6 例 (3.3%) であった。前回の検討と合わせると、この範囲の検体数は 10 例となった。

Miller らの検討では、200 mg/dL 以上の高 LDL-C 血症の検体が 5 例しかなく、日常臨床で遭遇する LDL-C の範囲を十分にカバーしていないと思われた。一方、50 mg/dL 未満の低 LDL-C 血症の検体は 3 例 (1.7%) しかなく、Miller らの検討では 13 例もあり、低 LDL-C 血症の頻度 (7.4%) 高すぎると思われた。

表 3：対象者の LDL-C 値の分布の比較

	Miller らの検討 (n=175)	前回の検討 (n=173)	今回の検討 (n=180)	合 計 (n=353)
健常群/疾患群	37/138	49/124	未確定	未確定
LDL-C (mg/dL)				
~300	1	1	0	1
299~200	4	4	6	10
199~100	?	119	120	239
99~ 50	?	46	51	97
49~ 0	13	3	3	6

最後に、採取した検体の HDL-C の分布を検討した (表 2)。HDL-C 値は、最大値が 239 mg/dL、最小値は 15 mg/dL だった。HDL-C が 100 mg/dL 以上で、本検討の除外対象となる検体が 7 例と多く、前回と合わせると

13 例になった。また、HDL-C が 20 mg/dL 未満の症例は 1 例のみであった。Miller らの検討では、著明な高 HDL-C 血症は 1 例のみだったが、逆に低 HDL-C 血症が 4 例あり、頻度が高すぎると考えられた。

表 4：対象者の HDL-C 値の分布の比較

	Miller らの検討 (n=175)	前回の検討 (n=173)	今回の検討 (n=172)	合 計 (n=345)
健常群/疾患群	37/138	49/124	未確定	未確定
HDL-C (mg/dL)				
~100	1	(6) 除外	(7) 除外予定	(13) 除外予定
99~ 80	6	18	8	26
79~ 60	?	41	60	101
59~ 40	?	87	88	175
39~ 20	?	21	16	37
19~ 0	4	0	(1) 除外予定	(1) 除外予定

b) 検討 2

外来および入院患者の生化学検体の残余検体 94 例について、グリセロール未消去法と消去法による TG 値の差として、遊離グリセロール濃度の分布を測定した。平均は 6.0 ± 5.4 mg/dL であった。10 mg/dL 以上の値を示す検体が 18 例 (19.1%) 認められ、なかには 20 mg/dL 以上の高い値を示す検体

もあった (図 1)。一部の症例では、遊離グリセロールがマイナスとなり、検体中の干渉物質の影響が疑われた。

94 例中 52 例については、遊離グリセロール濃度と遊離脂肪酸濃度を同時に測定した。両者の間には、有意な正の相関を認めた (図 2) ($Y = 0.0435X + 0.368$, $R = 0.701$, $p < 0.0001$)。

図 1：遊離グリセロール濃度分布

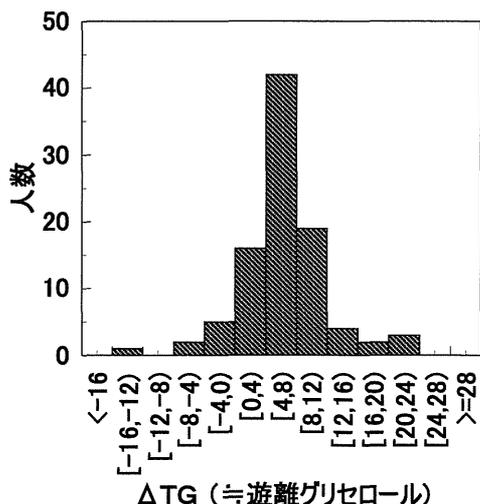
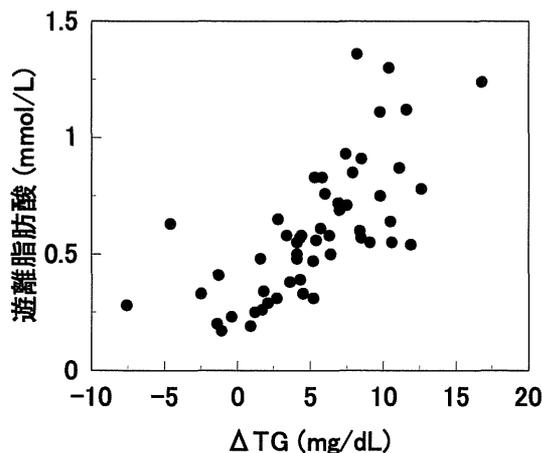


図 2：遊離グリセロール濃度と遊離脂肪酸濃度の関係



D. 考察

LDL-C と HDL-C の直接法は、リポ蛋白中のコレステロール濃度を測定する検査である。1990 年代に、我が国の試薬メーカーが、前処理をせず血清を使って直接これらを測定する方法を発表した。それまでは、LDL-C は研究室レベルで行われている超遠心法か計算式で、HDL-C も超遠心法か前処理を必要とする沈殿法でしか定量できなかった。現在では、LDL-C と HDL-C 直接法は、健診や医療施設におけるルチン検査として一般に使用されるようになった。

しかし、化学的な純物質が存在するコレステロールとは異なり、LDL-C や HDL-C 直接法は、標準物質を用いて精度管理することができない。さらに、直接法では、凍結検体や長期保存検体を用いると、マトリックス効果のために新鮮検体とは異なった測定値となることが知られている。そこで、本検討では、これまでの検討と同様に、新鮮な検体を新たに採取して正確性を検討することにした。検体の輸送・保存方法、測

定手技（大型自動分析機のメーカーと型番号なども含め）を前回と同様に行い、我が国で行われた検討結果を合わせて解析できるように計画した。

前回の検討では、TG が 1,000mg/dL 以上、HDL-C が 100 mg/dL 以上、LDL-C または HDL-C が 20 mg/dL 未満の場合に、直接法の正確性を検討する対象から除外した。しかし、この範囲内であっても、I 型 (n=1) および III 型高脂血症 (n=2) では、CDC の RMP 法と直接法の LDL-C の間に乖離が認められた。直接法は、LDL や HDL の組成が正常の粒子と著しく異なる場合に、異なる試薬間での測定値にばらつきが生じる。現在、今回の検討で集めた解析対象者の背景因子を調査中である。従来、胆汁うっ滞性肝疾患では直接法でうまく LDL-C や HDL-C を測定できないことが知られている。今回の検討で、直接法を使用すべきでないその他の疾患群を明確にすることが期待される。また、前回と今回のデータを一緒に解析することにより、食後検体でも LDL-C と HDL-C 直接法が正確

であるか、結論を出すことができると考えられる。

今年度から、TG 測定に関連して、遊離グリセロールの検討を新しく開始した。臨床検体において、遊離グリセロール濃度の個人差が予想以上に大きいこと、遊離グリセロール濃度と遊離脂肪酸濃度が有意に正相関することが示された。一般に、遊離脂肪酸は空腹時に高く、食事摂取で低下する。これは、空腹時に分泌が高まるカテコラミンの作用で、脂肪組織の TG がグリセロールと遊離脂肪酸に分解されるためと推定されている。以上の結果から、空腹時の遊離グリセロールは、脂肪組織の TG の分解を反映している可能性が考えられる。したがって、TG 測定法をグリセロール消去法からグリセロール未消去法に変えた場合、リポ蛋白由来でない TG（すなわち脂肪組織由来の TG）を血清 TG として測りこむ危険性があることがわかった。また、遊離グリセロール濃度に個人差が大きいいため、HbA1c の国際標準化で行ったように、一律に一定の値を加えて補正することができないことも示唆された。次年度では、肥満の有無や食事後の絶食時間なども加味して、遊離グリセロールを TG として測定すべきか否かさらに検討する予定である。

E. 結論

今年度は、LDL-C と HDL-C 直接法の正確性について信頼性のある結論を得るために、適切な検体収集をすることができた。比較対照法である。CDC の基準測定法で、一週間に最大 10 本までしか LDL-C と HDL-C の測定ができないことと、TG、LDL-C、HDL-C の

3 項目について解析のために望ましい値の範囲の検体を集めるのが困難であったため、検体収集に時間がかかってしまった。次年度には、前回の検討で得られた結果と合わせて、Error Component Analysis を行う予定である。

また、遊離グリセロールについての検討では、グリセロール未消去法とグリセロール消去法の 2 つの TG 値の差として、遊離グリセロール値を求めることの妥当性が検証できた。次年度は、遊離グリセロールと絶食時間の関係、ヘパリン使用者において様々な条件下で保存した検体を二法で測定した TG 値の安定性、肥満や内服薬等が遊離グリセロールに与える影響などを検討する計画である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis*, 233(1), 253-259, 2014.
- 2) Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H,

- Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K. Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique. *J Lipid Res*, 55(5), 905–918, 2014.
- 3) Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K. High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in Japan. *J Atheroscler Thromb*, 21(2), 151-160, 2014.
- 4) Idei M, Hirayama S, Miyake N, Kon M, Horiuchi Y, Ueno T, Miyake K, Sato N, Yoshii H, Yamashiro K, Onuma T, Miida T. The mean postprandial triglyceride concentration is an independent risk factor of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 430, 134-139, 2014.
- 5) Tabe Y, Jin L, Konopleva M, Shikami M, Kimura S, Andreeff M, Raffeld M, Miida T. Class IA PI3K inhibition inhibits cell growth and proliferation in mantle cell lymphoma. *Acta Haematol*, 131(1), 59-69, 2014.
- 6) Shoji H, Murano Y, Mori M, Matsunaga N, Ohkawa N, Suganuma H, Ikeno M, Hisata K, Hirayama S, Ueno T, Miida T, Shimizu T. Lipid profile and atherogenic indices soon after birth in Japanese preterm infants. *Acta Paediatr*, 103(1), 22-26, 2014.
- 7) Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui S-P, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T. Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children for the first early of life. *Clin Chim Acta*, 433, 1-4, 2014.
- 8) Nishioka E, Yokoyama K, Matsukawa T, Vigeh M, Hirayama S, Ueno T, Miida T, Makino S, Takeda S. Evidence that birth weight is decreased by lead at its maternal levels below 5µg/dl in male but not in female newborns. *Reprod Toxicol*, 47, 21-26, 2014.
- 9) Ikeda N, Shoji H, Murano Y, Mori M, Matsunaga N, Suganuma H, Ikeno M, Hisata K, Hirayama S, Ueno T, Miida T, Shimizu T. Effects of breastfeeding on the risk factors for metabolic syndrome in preterm infants. *J Dev Orig Health Dis*, 5(6), 459-464, 2014.
- 10) 三井田孝. 急性冠症候群では入院後すぐに脂質検査を. *Medical Practice*, 31(4), 670, 2014.
- 11) 平山 哲、三井田孝. 動脈硬化の新たなバイオマーカーを探る. *Vascular Medicine*, 10(1), 10-15, 2014.
- 12) 三井田孝, 平山 哲. 亜分画からみたHDL機能. *The Lipids*, 25(3), 929, 2014.
- 13) 三井田孝. non HDL-C. *Current Therapy*, 32(9), 225-231, 2014.
- 14) 三井田孝. バイオマーカーとしての脂質・リポ蛋白関連検査, *Lab Clin Pract*, 32(2), 43-47, 2014.

- 15) 三井田孝. 採血管を二度遠心してはいけないのはなぜですか? *Medical Technology*, 42(12), 1256-1257, 2014.
 - 16) 三井田孝. 脂質検査の読み方. (『パターンで把握する脂質異常症治療帽一押さえておきたい処方の変遷』(Jmedmook 31)), 寺本民生編, 東京, 日本医事新報社) 1-6, 2014.
2. 学会発表
- 1) 三井田孝. バイオマーカーとしての脂質・リポ蛋白関連検査 (シンポジウム: バイオマーカーの進歩). 第 24 回日本臨床検査専門医会春季大会, 2014, 札幌市
 - 2) 三井田孝. 血清脂質・リポ蛋白検査の正確性について (明日へのシンポジウム 2: 脂質検査の現状及び将来展望). 第 46 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会, 2014, 東京
 - 3) 三井田孝. 動脈硬化性疾患予防ガイドラインと脂質検査の読み方 (公開講座). 第 4 回 国際カイロミクロンシンポジウム, 2014, 東京
 - 4) 三井田孝. CDC リファレンス法による HDL-C ホモジニアス法の正確性の検討結果 (リポ蛋白検査専門委員会報告). 第 54 回日本臨床化学年次学術集会, 2014, 東京
 - 5) 上野 剛、平山 哲、小野塚麻里、昆美香、杉原匡美、糟谷 優、安部勝美、三井田孝. 妊娠時の血中微量金属濃度の経時的変化と胎児発育の関連. 第 54 回日本臨床化学年次学術集会, 2014, 東京
 - 6) 杉原匡美、三井田孝、平山 哲、上野 剛. non-HDL を使った脂質異常症のスクリーニングにおけるカットオフ値の有用性. 第 54 回日本臨床化学年次学術集会, 2014, 東京
 - 7) 平山 哲、宗田 聡、上野 剛、糟谷 優、杉原匡美、三井田孝. 2 型糖尿病患者の LPL 濃度に及ぼす肥満および関連因子の影響. 第 61 回日本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福岡市
 - 8) 上野 剛、平山 哲、小野塚麻里、杉原匡美、糟谷 優、安部勝美、三井田孝. 妊娠時の血中および尿中カルニチン濃度の変動. 第 61 回日本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福岡市
 - 9) 杉原匡美、小田切史徳、鈴木 剛、村山 尚、櫻井 隆、代田浩之、森本幸生、呉林なごみ、三井田孝. 自発的運動測定は拡張型心筋症モデルマウスのうっ血性心不全の判定に有用である. 第 61 回日本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福岡市
 - 10) 近藤成美、中村文子、三澤成毅、笹野 央、大坂 顯通、三井田孝. 当院における抗緑膿菌薬の使用量の変化と薬剤感受性の推移. 第 61 回日本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福岡市
 - 11) 出居真由美、田部陽子、三宅一徳、濱田千江子、三井田孝. 腹膜透析排液検査法の開発と腹膜劣化指標としての有用性の検討. 第 61 回日本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福岡市
 - 12) 田部陽子、山田宏美、堀井 隆、木村晋也、三井田孝、大坂顯通. WHO 国際標準準拠 BCR-ABL 補正パネル

を用いた施設固有 RQ-PCR 法の変換
係数算出と検出感度評価. 第 61 回日
本臨床検査医学会学術総会, 2014, 福
岡市

- 13) 脇田 満、山本美由紀、伊藤聡史、三
澤成毅、久野 豊、堀井 隆、田部陽
子、三宅一徳、三井田孝、大坂顯通.
直接ビリルビン測定における分析装
置の比較検討. 日本臨床検査自動化
学会第 46 回大会, 2014, 神戸市

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

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 西村 邦宏 国立循環器病研究センター 循環器病統合情報センター室長

研究要旨

【目的】 LDL 直接法試薬について、Miller らの論文により、疾患群で BQ 法と大きく乖離する場合があることが報告されている。一方我々は、高 TG 血症などでは乖離する場合があることを報告しているが、家族性高コレステロール血症、高 HDL 血症など特殊な検体について、どの程度の乖離が認められるかは従来詳細な検討は行われていない

【方法】 2014 年度、大阪大学、国立循環器病研究センターにおいて健常ボランティア 67 例、および脂質異常症などの患者検体 114 例に関して、LDL 直接法試薬と BQ 法による LDL 測定法の比較検討を行った。両者それぞれの三重測定の平均の差を BQ 法三重測定により除してバイアスを計算した。バイアスが±10%、5%を超える検体について、脂質異常症の分類を行い、バイアスの出現に関してロジスティック回帰により有意な関係を持つ因子に関して探索を行った。

【結果】 健常群、疾患群において男女比、身長、体重に関しては両群間で差を認めなかった。疾患群は平均年齢 54.7 歳であり、健常群と比べて有意に高齢であった。（表 1）（ $p < 0.001$ ）疾患群中の脂質異常症の内訳に関しては、II a, II b, ヘテロを含む家族性高コレステロール血症がそれぞれ 14%, 14%, 13.2%であった。（表 2）バイアスが 10%を超える検体の内訳を示す。（表 3）III 型、中性脂肪高値（ $TG \geq 600 \text{mg/dl}$ ）は有意に測定異常の出現に関連していた。（表 5）そのほか高 HDL 血症、家族性高コレステロール血症などで測定異常を認めることが多いと考えられた。一方で食後検体での測定は測定異常とは有意に相関していなかった。

【総括】 LDL 直接法試薬の測定において測定異常が出現する要因を検討した。脂質異常のうち III 型、中性脂肪高値（ $TG \geq 600 \text{mg/dl}$ ）をきたしやすく、その他高 HDL 血症、家族性高コレステロール血症などが要因と考えられた。空腹時測定との関連は薄く、健診、日常診療の範囲内では問題なく使用可能と考えられた。

A. 研究目的

米国の Center for Disease Control and Prevention : CDC は beta-quantification (BQ 法) を LDL 測定の際標準化の手法として採用しているが、超遠心など測定には困難が伴う。動脈硬化学会のガイドラインなどでは総コレステロール、中性脂肪、HDL より計算する F 式により計算を行うよう求めているが、空腹時に限られ、中性脂肪 400 以上では近似ができないなどの問題があり、比較的簡便に測定できる LDL 直接法試薬は広く普及している。Miller らにより試薬が特に LDL 低値の場合などに測定が不正確になることを報告したこと (Clin Chem 2010;56:977-86) を受けて、我々は試薬性能の検討を行い、特に高 TG 血症では測定精度で問題があることを報告した。

(Atherosclerosis 225 (2012) 208-215)。これを受けて一部の業者では試薬の改良を進めている。しかし、III型高脂血症、家族性高コレステロール血症など比較的まれかつ LDL の機能異常を合併していると考えられる症例に関する検討はこれまで十分に行われていない。

本研究では、前回の性能評価と同様のデザインで、LDL 直接法の性能評価を脂質異常を専門とする施設の外来患者及び食後検体を中心とした健常ボランティアの検体を用いて行った。

B. 研究方法

LDL に関しては Hitachi 917 により三重測定を行った。BQ 法に関しては国立循環器病研究センター基準分析室で 20 年以上の米国 CDC による the Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) に参

加している熟練者により行われた。

大阪大学医学部付属病院及び国立循環器病研究センターで参加を呼びかけた健常ボランティア 67 例、および脂質異常症などの患者検体 114 例に関して測定を行った。

BQ 法による測定を真値として、同一患者からの検体に対して、LDL 直接法を 3 重測定し、その平均値と BQ 法 3 重測定した結果の平均の差をとり、真値により除したのから測定時のバイアスを検討した。

バイアスが ±10%、5% を超える検体について、脂質異常症の分類を行い、バイアスの出現に関してロジスティック回帰により有意な関係を持つ因子に関して探索を行った。

全ての解析は STATA (ver. 11 College Station, TX, USA) により行った。

(倫理面への配慮) 本研究は、匿名化された既存資料を用いた調査であり、介入を伴わず、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

両群の臨床背景を表 1 に示す。

健常群、疾患群において男女比はそれぞれ 32.8%、32.5% であり有意差を認めなかった。身長、体重に関しては両群間で差を認めなかった。(168.3cm vs 165.3cm, 67.7 kg vs 67.6kg) 疾患群は平均年齢 54.7 歳であり、健常群(平均 41.4 歳)と比べて有意に高齢であった。(表 1) ($p < 0.001$) 疾患群中の脂質異常症の内訳に関しては、II a, II b, ヘテロを含む家族性高コレステロール血症がそれぞれ 14%, 14%, 13.2% であった。その他に高 HDL 血症、LPL 欠損症などを認めた(表 2) バイアスが 10% を超える検体の内訳を示す。(表 3) III型では 4 例中 3 例で測定異常を認めた。他にも高 HDL 血症 3 例、

CETP 欠損などで測定異常が見られた。中性脂肪が 1000mg/dl を超える 3 検体については、前回の検討と同様に解析から除外した。(図 1)

バイアス 10% を目的変数としてロジスティック回帰を行うと、Ⅲ型高脂血症は $OR=18.24$ と有意に測定異常出現と関連した。($p=0.013$)、中性脂肪高値 ($TG \geq 600\text{mg/dl}$) も高いリスク比を示し、有意に測定異常の出現に関連していた。($p=0.005$) そのほか高 HDL 血症、家族性高コレステロール血症などで測定異常を認めることが多いと考えられたが、他の分類、疾病に関しては有意な相関は見られなかった。食後検体に関しても検討を行ったが測定異常の出現とは関連が見られなかった。($OR=0.53$, $P=0.133$) 今回の検討は検討を行った 4 社の内一社について行ったが、基本的な傾向に関して 4 社で共通であった。

D. 考察

本研究では、家族性高コレステロール血症、高 HDL 血症など特殊な検体について、どの程度の測定値の乖離が認められるかについて検討を行った。

前回の検討でもⅢ型に関しては、測定異常が出現しやすいことが示唆されていたが、今回の検討で同様の傾向が明確に示された。

また中性脂肪 600mg/dl 以上では乖離が起りやすいことが示された。LDL に関する F 式が中性脂肪 400mg/dl 以上では使えないため、前回の報告と合わせて中性脂肪高値の場合の測定限界が明らかになったと思われる。

一方、前回の検討では食後検体が少ないため、食後検体の測定精度に関する検討が不

可能であったが、今回は 91 例が食後採血であり、検討が可能であった。バイアス 10% 及び 5% 以上の測定異常の出現のリスク比は上昇しておらず、食後検体での測定について LDL 直接法で問題なく測定できる可能性が示唆された。

今回の検討では、比較的出現頻度の少ない家族性脂質異常症などにおける検討となつたため、前回行ったエラーコンポーネント解析等を行わなかった。また健常ボランティアとして募集した対象者の内脂質異常を認めるものについては、脂質異常の分類が行われていないため、今後、残余検体によりより正確な分類を行った上で検討する必要がある。

前回の対象者と結果をプールした上で、食後検体の測定精度の確認を行うとともに、異常値を示した検体については、アポ蛋白測定などを行い、機能異常と測定値乖離などの要因について、より詳細な検討を行っていく予定である。更に本例の対象となった特殊病態において F 式の測定精度についても検討を加えていく予定である。

E. 結論

LDL 直接法試薬と BQ 法測定を比較し、試薬の性能限界について検討を行った。特にⅢ型高脂血症、中性脂肪 600mg/dl 異常の検体では測定値が真値と乖離する傾向が見られた。食後の測定には特に影響が見られず、特定健診、職域健診など食後に受診する可能性が高い状況でも測定に問題がないと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中 なし

2. 学会発表

なし

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

表1 臨床背景

	健常者	疾患群
	N=67	N=114
女性	32.8%	32.5%
年齢	41.4	54.7
身長	168.3	165.3
体重	67.7	67.6
食後検体	80.3%	30.7%

表2 疾患群中の脂質異常症の内訳

Type	割合
II a 型	14.0%
II a 型	14.0%
III 型	3.5%
FH	13.2%
IV 型	0.9%
V 型	0.9%
CTX	1.8%
LPL 欠損症	1.8%
高 HDL 血症	3.6%
シトステロール血症	0.9%

表3 中性脂肪の分布

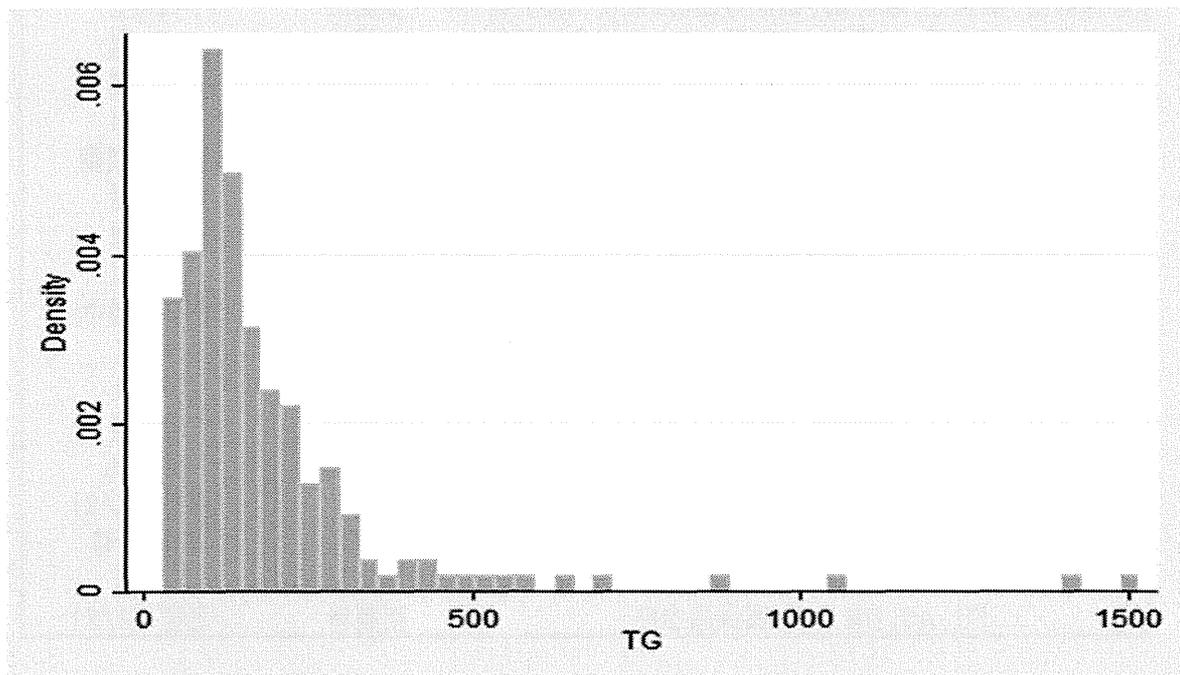


表3 バイアスを超えた疾患群の検体の内訳

診断	採血条件	脂質異常症分類
貧血	空腹時	高HDL
陳旧性心筋梗塞、高TG血症、高尿酸血症、高血圧	空腹	Ⅲ型(E2/2)
心房細動、高血圧、糖尿病、高尿酸血症、脂質代謝異常	空腹時	Ⅱb型
心房細動、高血圧、糖尿病、高尿酸血症、脂質代謝異常	空腹時	Ⅱa型
脂質代謝異常、アルコール性肝障害、高尿酸血症	空腹時	Ⅱa型
脂質代謝異常	空腹時	高HDL
脂質代謝異常	空腹時	LPL欠損症
脂質代謝異常	空腹時	Ⅱb型
脂質代謝異常	空腹時	Ⅱb型
脂質代謝異常	空腹時	高HDL
高尿酸血症、脂質代謝異常、高血圧	空腹時	CETP欠損ホモ
高血圧、糖尿病、脂質異常	食後	不明
高血圧、脂質異常	食後	不明
高血圧、脂質	空腹時	Ⅱb型
高血圧、高尿酸血症	空腹時	高HDL
Ⅲ型HL、高血圧	空腹時	Ⅲ型(E2/2)
FH、陳旧性心筋梗塞	空腹時	FHヘテロ
FH、狭心症、糖尿病、高血圧	空腹時	不明
FH、AS、DM、HT、高尿酸血症	空腹時	Ⅲ型(E2/2)

表4 バイアスが10%を超える場合と相関する要因

	OR	P-value	95% CI	
Ⅲ型	18.24	0.013	1.82	182.36
TG>600	12.58	0.005	2.18	72.50
Ⅱa型	1.96	0.277	0.58	6.58
Ⅱb型	0.76	0.732	0.16	3.56
食後測定	0.53	0.133	0.23	1.22

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

「糖尿病患者に合併するレムナント蓄積に対するシタグリプチン投与の有効性
～アポ蛋白B-48濃度の改善効果」

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

食後にカイロミクロンレムナント(CM-R)の蓄積を食後高脂血症といい、多くの基礎研究からこのCM-Rは動脈硬化プラークの形成・進展に繋がることが示されている。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、昨年度の検討で空腹時アポB48濃度が冠動脈狭窄罹患率と最も強く相関し他の動脈硬化性疾患リスク因子の重複で増悪する事を突き止めた。これらレムナントの蓄積は糖尿病患者に高率に認められ、カイロミクロンレムナント(CM-R)が蓄積している。近年、糖尿病患者に対しDPP4阻害薬が使用されるようになってきているが、これは小腸でのGLP1の増加を来す小腸に働く薬物である。そこで、シタグリプチン投与がCM-Rを含めたりポ蛋白代謝の改善に有効かについて検討した。II型糖尿病患者38例に現在の治療に追加してシタグリプチンを50mg/日から投与しHbA1c7.4%以下を目標に100mg/日まで増量した。12週間の内服により空腹時血糖・HbA1cのみならずTG・non HDL-Cが有意に低下した。また各アポ蛋白およびapoB-48・RemL-Cが低下し、VLDLおよびLDL分画でのリポ蛋白粒子の低下を認め、シタグリプチンの投与が小腸および肝臓由来のリポ蛋白代謝改善に有用であることが判明した。以上のことから、シタグリプチンは糖尿病患者における動脈硬化リスクを上昇させる脂質代謝異常とくにレムナント代謝異常を改善する治療薬であることが判明した。

共同研究者

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、大久保学
大阪中央病院 内科部長 中川智佐 循環器内科部長 柳光司 医長 西田義治 医師 西尾宗高

A. 研究目的

糖尿病患者では脂質代謝異常のうち高中性脂肪(TG)血症の合併が高率であり、その背景には食後のTG-richリポ蛋白(TRL)代謝異常が存在している。TRLは小腸由来のカイロミクロン(CM)および肝臓由来VLDL、さらにそれらがリポ蛋白リパーゼ(LPL)により小粒子化したレムナントにより構成される。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。特に近年組織学的な検討から、小腸由来のカイロミクロンレムナント(CM-R)は肝臓由来のVLDLレムナントに比べ血中濃度は1/100程度しかなくにもかかわらず、**plaque**中には同量から倍量存在しており強い動脈硬化惹起性を有していることが示唆されている。糖尿病患者におけるこれらレムナントの蓄積は動脈硬化**plaque**を進展させ心血管イベントを高率に発生させることから糖代謝のみならずレムナント代謝の改善の必要がある。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(ELISA法¹・CLEIA法²)、アポB-48濃度は食後高脂血症を反映しIIb型高脂血症³・CD36欠損症⁴・高CM血症¹で高知でありスクリーニングに使用しうる⁵。さらに、アポB-48濃度は頸動脈内膜中膜複合体肥厚度⁶や冠動脈有意狭窄罹患率⁸と強く相関し動脈硬化惹起性を評価しうる。以上のように空腹時アポB-48濃度は、動脈硬化惹起性を有するCM-Rの蓄積に強く相関しておりレムナント蓄積を評価しうる事が判明した。

近年、消化管ホルモンであるインクレチンの分解を抑制し血糖依存的にインスリン・グルカゴンの分泌を調節するジペプチジルペプチダーゼ4(DPP-4)阻害薬が上市された。DPP-4阻害薬は血糖改善効果に加え基礎実験ではあるがTGやCM-Rの抑制が報告されている⁸。また少数例ではあるがメトホルミン服用患者にDPP4阻害薬シタグリプチンを併用すると空腹時および食後の脂質が改善されるという効果が報告されている⁹。

以上のことから、我々は、選択的DPP-4阻害薬であるシタグリプチン(グラクティブ錠[®])を日本人2型糖尿病患者に対して使用することで、血糖改善効果はもちろぬ脂質代謝特にレムナントリポ蛋白の蓄積を改善しうるかどうかについて検討を行った。

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 Eur J Clin Invest. 2012;42(9):992-9. ⁸ Diabetologia. 2010;53:552-561. ⁹ Diabetes, Obesity and Metabolism(2011;13(4):366-373.

(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、蒼生病院、大阪中央病院の各IRBにて承認され、すべての参加者に説明を行いから文書にて同意を得た。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

大阪大学医学部附属病院、大阪中央病院、蒼生病院において作成した研究計画をIRBにおいて倫理審査を受け病院長より承認を受けた。通院中あるいは入院中の患者を対象とし、以下の選択基準を全て満たし、除外基準のいずれにも該当しない患者を対象とした(性別は問わない)。選択基準としては、①20歳以上の2型糖尿病患者で、HbA1cが8.4%以下(NGSP値)、②食事療法、運動療法のみで治療中あるいは食事療法、運動療法に加えてスルホニルウレア(アマリール、オイグルコン、グリミクロン、ダオニール)、チアゾリジン(アクトス)、ピグアナイド(メルビン、グリコラン、ジベトスB、メトグルコ)、 α -グルコシダゼ阻害剤(ベイスン、セイブル、グルコバイ)あるいはインスリン製剤を使用している患者、③十分な説明を受けた後、理解の上、患者本人の自由意思による同意が書面により取得できた患者、を対象とした。除外基準としては、①1型糖尿病、②血清クレアチニン値男性Cr>2.5 mg/dL・女性Cr>2.0 mg/dLあるいは血液透析中、③アマリール2mg、オイグルコン1.25mg、グリミクロン40mgを越え投与中、④DPP4阻害薬投与中、⑤1ヶ月以内の脂質異常症治療薬の変更、⑥妊娠中・妊娠の可能性・授乳中、⑦甲状腺機能障害、⑧重症肝障害(AST・ALT \geq 100 IU/L)、⑨担当医が不適当と判断、の患者とした。通常の外来採血のデータから適応を判断した上で登録を行い、現在の糖尿病治療に加えてシタグリプチンを50mg/日で投与開始しHbA1c7.4%以下を目標に100mg/日まで増量可能とした。投与前、投与開始4、12週間後に空腹時採血を

実施し、糖代謝マーカーとして血糖、HbA1c、インスリン、グルカゴン濃度を、脂質マーカーとしてLDL-C、HDL-C、TG濃度を、さらにリポ蛋白代謝マーカーとしてアポ蛋白(AI、AII、B、CII、CIII、EおよびB-48)およびRemL-C濃度を測定した。さらに、治療前後におけるリポ蛋白プロファイルの検討のため、High Performance Liquid Chromatography(HPLC)による連続的にリポ蛋白分画ごとのTC濃度、TG濃度を測定した。さらに代謝マーカーとしてアディポネクチン・オメチンチンを測定した。以上それぞれの投与前・投与後の数値をpaired t-testを用いて検討しどのように変化したかを観察した。

C. 研究結果

12週間の内服により空腹時血糖(投与前値 vs 投与12週間後値、 150 ± 47 vs 129 ± 27 mg/dl, $p<0.01$)およびHbA1c(7.1 ± 0.6 vs 6.6 ± 0.7 mg/dl, $p<0.001$)は有意に低下したが、インスリン・グルカゴン値は変化を認めなかった(図1)。また脂質マーカーはLDL-C・HDL-C濃度に変化を認めなかったが、TG(161 ± 90 vs 130 ± 66 mg/dl, $p<0.01$)およびnon HDL-C(129 ± 29 vs 116 ± 20 mg/dl, $p<0.01$)濃度はいずれも有意に低下した(図2)。さらにapoB-48(7.8 ± 6.7 vs 5.6 ± 4.0 μ g/ml, $p<0.01$)およびRemL-C(15.3 ± 9.5 vs 12.0 ± 7.9 mg/dl, $p<0.05$)は有意に低下し(図3)、さらに、アポ蛋白の検討では有意に低下した(図4)。リポ蛋白分画もVLDLおよびLDL分画で有意な低下を示していた(図5)。これらの変化はシタグリプチンの投与が糖代謝のみならず、リポ蛋白代謝(小腸および肝臓由来レムナント)の代謝のいずれも改善させていることを示唆した。

D. 考察

今回の検討は近年動脈硬化性疾患の独立したリスクである糖尿病患者におけるレムナント蓄積がDPP4阻害薬sitagliptinの投与により改善することを示した初めての結果である。従来より示されていたように、DPP4の阻害によりインクレチン濃度上昇からインスリン分泌促進作用が起こり血糖が低下する。今回の検討でも従来示されているように12週間の投与による血糖の低下(-21 mg/dl)・HbA1cの低下(-0.4%)を確認した。インスリン促進作用・グルカゴン抑制作用が予想されるが空腹時血中濃度には大きな変化を認めなかった(図1)。脂質代謝に関しては従来指摘されているように空腹時高TG血症の抑制が見ら

れTG値が低下していた(-21 mg/dl)。それだけでなく、TC、LDL-Cに関しても低下を認めた(図2)。DPP4阻害薬投与に伴うコレステロールの低下作用については従来報告がなく、今回の報告からDPP4阻害薬投与によるコレステロール抑制の可能性も示唆された。今回の検討でもっとも変化が見られたのはレムナントの抑制であり、nonHDL-C、RemL-Cといったレムナント総量を表すバイオマーカーおよび特に動脈硬化惹起性が強いアポB-48濃度のいずれも有意に低下を認めた(図3)。このことは糖尿病患者に認められるレムナントの蓄積に伴う動脈硬化惹起性を改善する可能性が考えられ、DPP4阻害薬の糖質・脂質代謝の双方に対するdual effectの可能性が示唆された。この変化のリポ蛋白プロファイルを検討するためアポ蛋白の測定とHPLCを行った。この結果、アポB、C2、C3、およびEのいずれも投与により低下し、HPLCではVLDL、LDLおよびHDL分画でのコレステロール・TG濃度がいずれも抑制されていた(図4、5)。これは内因系径路であるVLDL、IDL、LDLといったアポB-100含有リポ蛋白の抑制とCM、CM-RといったアポB-48含有リポ蛋白のいずれも抑制していることを示唆するものである。すなわち、DPP4阻害薬によるリポ蛋白プロファイルは小腸及び肝臓のいずれにおいてもリポ蛋白数が抑制されることが示され、これはリポ蛋白代謝異常に伴う動脈硬化惹起性を抑制することが示唆された。今後、これらのメカニズムについてマウスなど動物モデルを用いて検討する予定である。

E. 結論

シタグリプチンの投与は糖代謝のみならず動脈硬化惹起的なレムナント代謝も改善し得ることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

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

図1 糖代謝に関するバイオマーカーの変化

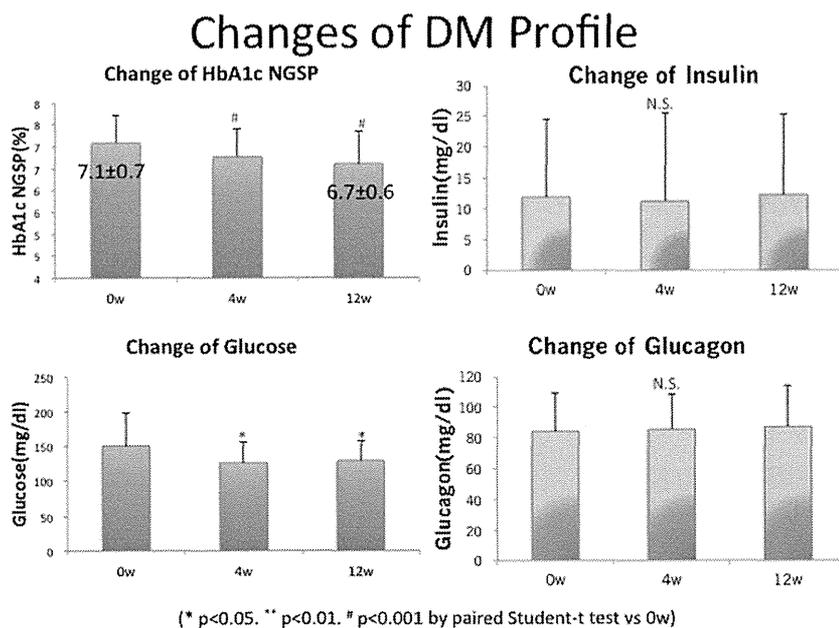


図2 脂質代謝に関するバイオマーカーの変化

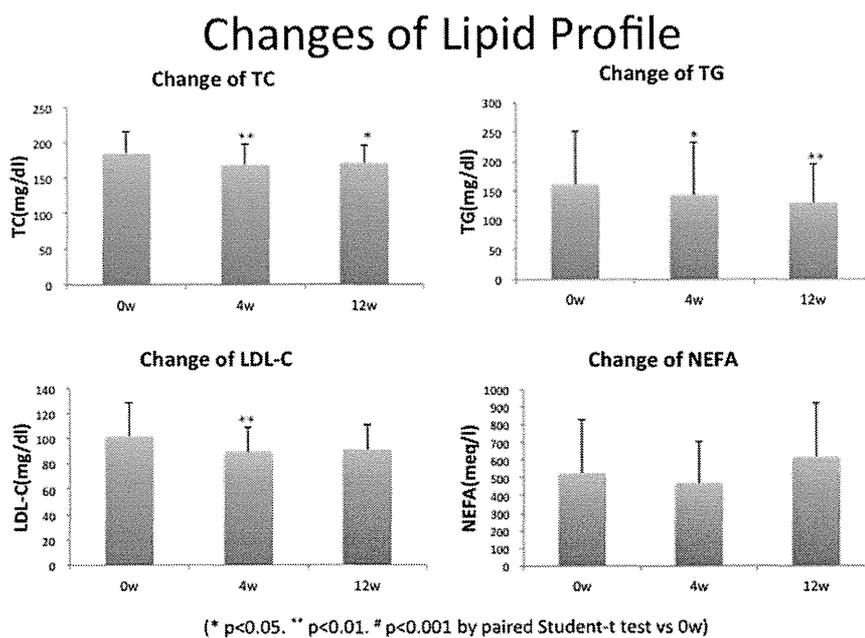


図3 レムナントに関するバイオマーカーの変化

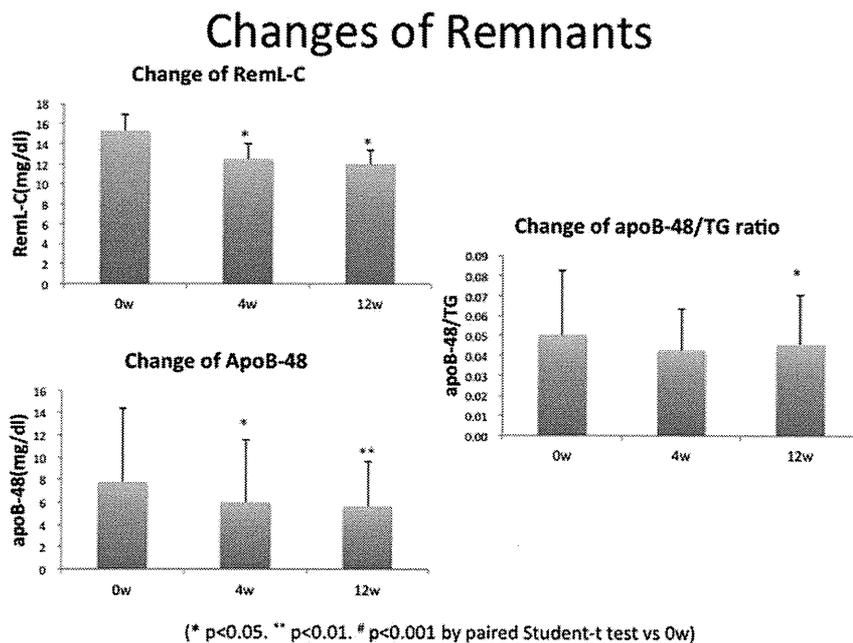


図4 アポ蛋白の変化

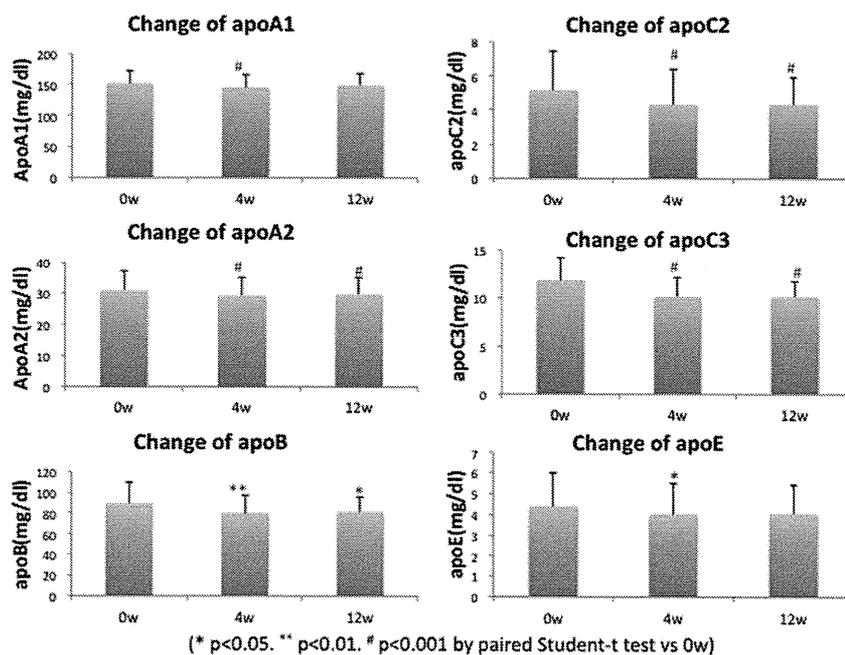
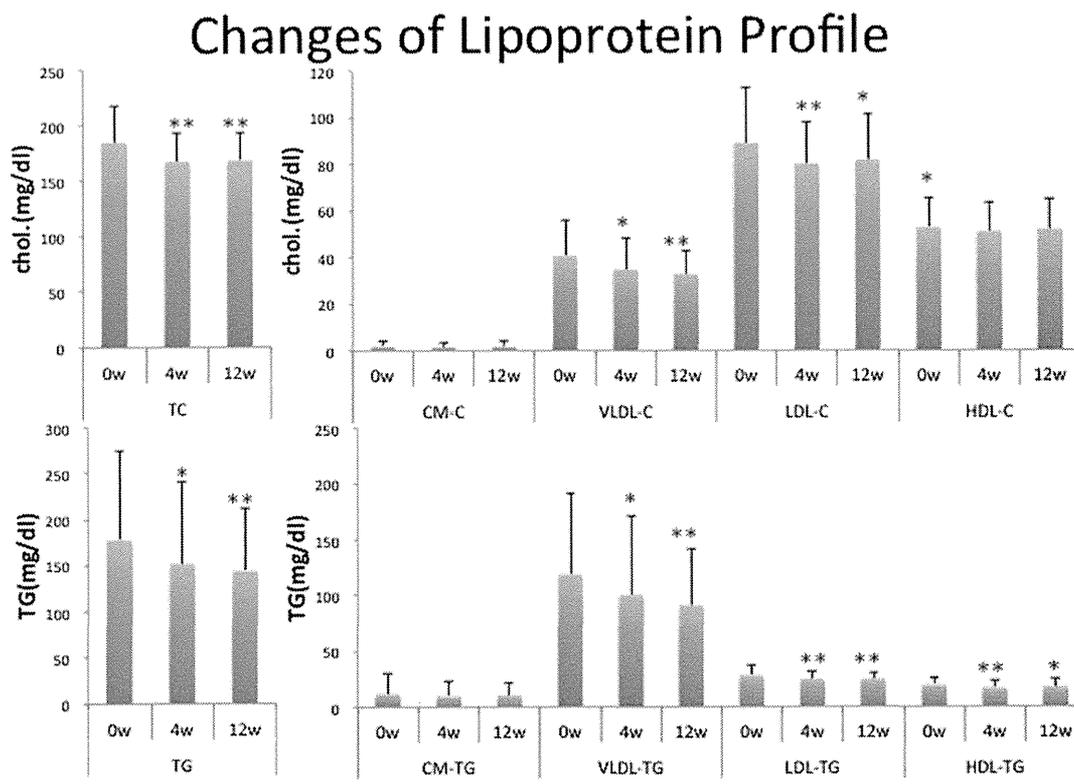


図5 リポ蛋白の変化



(* p<0.05. ** p<0.01. *** p<0.001 by paired Student-t test vs 0w)

分担研究報告書

平成 26 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

HDL コレステロールの基準分析法(Ultracentrifugation 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循環器病統合情報センター統計解析室 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・循環器病統合情報センター 部長

研究要旨

脂質異常症の診断基準の適用に際しては、先ず第一に、LDL コレステロール(LDL-C)、あるいは、non-HDL-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つつある。HDL コレステロール(HDL-C)の低値は冠動脈疾患の発症リスクとなり、逆に高いほどリスクが減少するとされることから、HDL-C 値を正確に測定することは診断基準の運用に際して重要である。HDL-C の基準分析法は、CDC を始め、多くの疫学・臨床分野の研究機関が採用してきた超遠心法(Ultracentrifugation 法)とされる。超遠心法は超遠心機や超遠心用のチューブの操作技術を含め高度な技術が要求されることから、日常分析には馴染まない上に、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、測定上の課題は少なくない。この課題を克服するための実用的な臨床検査法として、1997 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、8 分程度の短時間で HDL-C を測定する簡便な直接法を次々と開発し、その後、世界中の臨床検査室で使われるようになった。特に心疾患の克服を国家的課題とする米国は、LDL-C と共に、HDL-C にも関心の高い国である。このような背景の元に、米国の Miller らは、わが国で開発された 8 社の HDL-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)、検体の中には稀なりが蛋白異常症が少なからず含まれており、米国の評価成績をわが国の日常臨床の場にそのまま適用することは、必ずしも適切ではなかった。その後、三井田らは、わが国の患者を代表するような検体を選択して HDL-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直接法への影響、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為の追加研究が実施され、あらためて直接法の再評価がされる。

HDL-C の正確な目標値を確定する基準分析法は、Ultracentrifugation(UC)法とされる。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 17 年間にわたり、継続して UC 法の標準化を行ってきた。UC 法は、これまでに大規模疫学共同研究や国際的な臨床試験等において、HDL-C の目標値を提供する役割を担ってきた。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、最近 17 年間の CDC による標準化成績を集計し、論文化して Clinica Chimica Acta に投稿し、2014 年 10 月 28 日に受理された(3)。本分担研究報告書では、HDL-C の基準分析法である UC 法の測定精度について記述する。