

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

今年度は、健常群と患者群から空腹時および食後に 183 検体を採取した。検体は、大阪大学と国立循環器病研究センターの 2 施設において、インフォームドコンセントを取得した者から採取した。血清を分離後に 2 本に分け、1 本は CDC の基準法により、もう 1 本は直接法により LDL-C と HDL-C を測定した。直接法は、国内で最もよく使用されている上位 4 試薬を用いた。現在、対象者の背景を調査中で、前回の検討で測定した 173 検体のデータと合わせて詳細に解析を行う予定である。

一方、欧米と我が国の TG 値の差の原因である遊離グリセロールを、グリセロール未消去法とグリセロール消去法の TG 値の差として測定した。遊離グリセロールには大きな個人差を認めた。次年度に、臨床的な背景と遊離グリセロールの関係を検討する計画である。

A. 研究目的

LDL-C と HDL-C の直接法は、日常診療や健診などで広く用いられている。我々は、新鮮な検体を用いて、LDL-C と HDL-C 直接法の正確性について検討し、2012 年と 2014 年にその結果を報告した。その結果、性能が不良だった試薬の製造販売の中止や、試薬の改良、キャリブレーションの値付けの変更などの改善につながった。しかし、特に LDL-C 直接法の正確性については、十分に検証されたとは言えない。また、直接法の利点の一つに食後の検体でも測定できることがあげられるが、前回の検討では検体数が不足であったため、食後検体のみで正確性を確かめることができなかった。

前回の我々の検討では、先行研究である Miller らの検討で用いられた Error

Component Analysis を用いて統計解析を行った。この方法は、採取する検体の分布に著しい偏りがあると結果に大きく影響することが知られている。そのため、信頼性のある結果を得るためには、トリグリセライド (TG)、LDL-C、HDL-C の分布に偏りのない集団から検体を得る必要がある。そこで、今年度は、検体の脂質値の分布を確認しながらサンプルを採取し、LDL-C と HDL-C を直接法と米国疾病管理予防センター (CDC) の基準法 (RMP 法) で測定した。

一方、「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版」では、LDL-C 直接法の正確性について十分な検証が行われていないことから、原則として LDL-C は計算式で求めることを推奨している。計算では、総コレステロール、HDL-C とともに TG を使用する。

しかし、欧米では遊離グリセロールも含めて TG として測定するのに対し、我が国では遊離グリセロールをあらかじめ消去してから TG を測定している。世界的には、遊離グリセロールを含めた TG の測定法(グリセロール未消去法)が主流を占めている。遊離グリセロール値がどれほどであるのか、病態によって差があるのかなど、詳細はよくわかっていない。そこで、生化学検査を行った残余検体を用いて、遊離グリセロールの濃度を調べた。

## B. 研究方法

### a) 検討 1 : LDL-C 直接法および HDL-C 直接法 (4 社) の正確性の検討

国立循環器病研究センターと大阪大学医学部附属病院において、成人被験者から、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、2 本に分けた。これらの検体は、4 以下に保って 24 時間以内に直接法または RMP 法で LDL-C と HDL-C を測定した。

2 本に分けた検体のうちの 1 本は、国立循環器病研究センター予防健診部の脂質基準分析室(国内で唯一 CDC の認証を受けている)に送った。超遠心法で 1.006 より軽い分画をチューブスライサーで除去した上層(分画 )と、その下層にヘパリン・マンガンを添加してアポ B 含有リポ蛋白も除去した上清を得た(分画 )。分画 とのコレステロール濃度は Abell-Kendall 法で定量した。LDL-C は [分画 のコレステロール濃度] - [分画 のコレステロール濃度] で求め、分画 のコレステロール濃度を

HDL-C とした。

2 本に分けた血清のうちもう 1 本は、京都府立医科大学検査部へ 4 以下で凍結しないように輸送した。先行研究と同じ分析機である Hitachi 7170 を用いて、4 社の LDL-C および HDL-C 直接法(表 1)で LDL-C および HDL-C を測定した。

### b) 検討 2 : グリセロール未消去法と消去法の 2 種類の TG 測定試薬を用いた遊離グリセロール測定の検討

生化学検査の残余血清を用いて、血清 TG 値を、グリセロール未消去法とグリセロール消去法の 2 法で測定した。両者の差を、遊離グリセロール濃度とし、その分布を調べた。また、一部の検体は凍結保存し、後日に遊離グリセロール測定と同時に、遊離脂肪酸濃度も測定し、両者の関係を調べた。

#### (倫理面への配慮)

検討 1 では、被験者に説明文書を用いて本検討の趣旨を説明し、文書によるインフォームドコンセントを得た。データは、検体採取施設で匿名化し、サンプルの測定は匿名化番号を用いて行った。なお、本検討のプロトコルは、順天堂大学、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ている。

検討 2 では、生化学検査が終了した残余検体を用い、匿名化後に日本臨床検査医学会の勧告に従って測定を行った。なお、本検討のプロトコルは、順天堂大学、東邦大学佐倉病院、東京女子医科大学、信州大学、の倫理委員会で承認を得ている。

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) <sup>1, 2)</sup>	前回の検討 (n=173) <sup>3)</sup>	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? <sup>4)</sup>	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  $6.0 \pm 5.4$  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

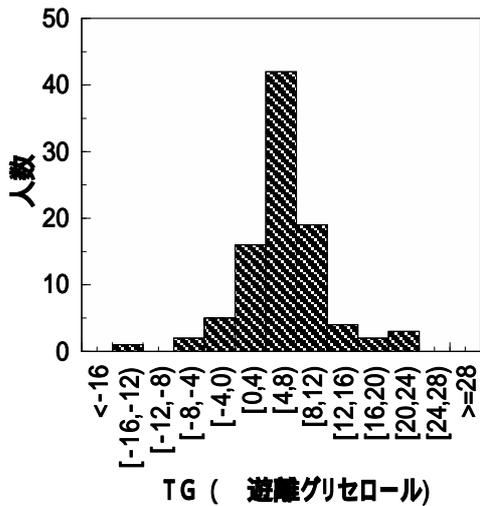
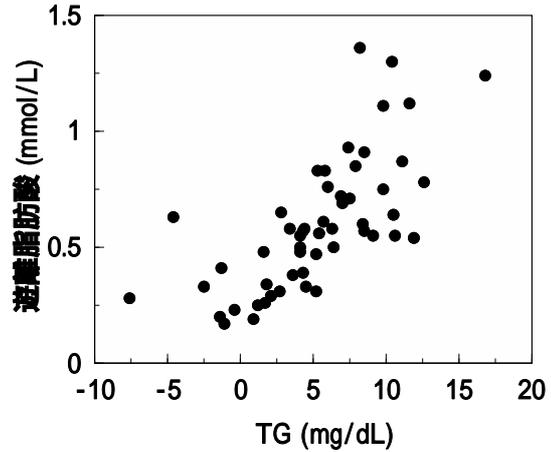


図2：遊離グリセロール濃度と遊離脂肪酸濃度の関係



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が計算式で、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、型 (n=1) および型高脂血症 (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 - 押さえておきたい処方方のバリエーション (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