

総括研究報告書

「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」

研究代表者 寺本民生 帝京大学医学部臨床研究医学講座 特任教授

研究要旨

本研究は、(1)わが国におけるnon HDLの冠動脈疾患(CAD)リスクとしての意義をLDL-Cとの比較という観点から疫学手法で検証、(2)どのような条件(患者背景・脂質レベル・採血時間など)で測定した場合にLDL-C直接法が信頼できるのか、(3)高脂血症のタイプや採血条件により直接法で測定したLDL-Cとnon HDLの関係が異なるのか、という3点を明らかにすることを目的とした。この目的完遂のため、平成25年度から、疫学グループと臨床検査グループに分けて検討した。1. 疫学グループは、昨年度までの研究により、non HDLのCADの予測能はLDL-Cに勝るとも劣らないということが証明されたことから、実際のカットオフ値の値付けの検討を行った。吹田研究で、条件のあう3822名(男性1755名、女性2047名、平均観察期間13年、虚血性心疾患の発症件数126例)の検討から、non HDL:190mg/dlを当てはめた場合、ハザード比1.77(95%信頼区間1.20-2.63)、AIC:1873.46、BIC:1929.70とLDLCを含めた他の15個のカットオフ値を用いた場合と比べて、統計学的に最もあてはまりのよい結果となった。2. 臨床検査グループは、昨年度に収集した183検体のうち、解析対象の基準を満たした168検体(健常群, n=59; 疾患群, n=109)において、市場のシェアが最も大きい4社のLDL-C直接法とCDCの基準法(BQ法)でLDL-Cを測定し、両者の関係を調べた。健常群および患者群において、空腹時か食後かに関わらず、全試薬において両者は良好な相関を示した。試薬間の大きな差異は認めなかった。また、測定済みのデータを用いて、健常群と脂質異常症群でnon HDL-CとアポBの関係を調べた。健常群ではnon HDLはアポBと強い正相関を示した。この関係は、a型・b型高脂血症でも同様だった。型・型・型高脂血症では、non HDLの値に比べアポBが低値を示す検体が少なくなかった。non HDLを脂質異常症のスクリーニングに用いる際には、高TG血症を合併する際に注意が必要であると考えられる。さらに、今年度は4回の講演会を各地で行い、実地医家からアンケート調査を実施し、約75%の医師がnon HDLを使用することに賛意を示した。

以上のことから、non HDLを特定健診に用いることは疫学的観点、臨床検査的観点から妥当と考えられ、そのカットオフ値を190mg/dlとすることが妥当と考えられた。

A . 研究目的

本研究は、(1)わが国における non HDL の冠動脈疾患 (CAD) リスクとしての意義を LDL-C との比較という観点から疫学手法で検証、(2)どのような条件 (患者背景・脂質レベル・採血時間など) で測定した場合に LDL-C 直接法が信頼できるのか、(3)高脂血症のタイプや採血条件により直接法で測定した LDL-C と non HDL の関係が異なるのか、という3点を明らかにすることを目的とする。最初の2年間で、non HDL の CAD 発症予測能は LDL-C に勝るとも劣らないことが判明したので、本年度は CAD 予測能の優れるカットオフ値の値付けを検討することとした。また、LDL-C の直接法の正確度に関する研究では、これまで、問題となった試薬の改善を求め、改善された試薬を用いて、どのような環境下で LDL-C 直接法を活用できるか検討することとした。

B . 研究方法

1 . 疫学的検討 : 本研究の対象は吹田研究に参加した 6483 名のうち、ベースライン調査時に 40 歳未満又は 75 歳以上である 1558 名、脳梗塞又は虚血性心疾患の既往がある 122 名、非空腹時採血 392 名、脂質降薬使用 103 名、TG400 mg/dL 以上 75 名、追跡不能又は欠損値あり 411 名を除いた 3822 名 (男性 1755 名、女性 2047 名、平均観察期間 13 年) とした。非空腹時採血者及び TG 400 mg/dL 以上の対象者を除外した理由は、LDL-C を Friedewald 式にて算出しているためである。

エンドポイントである虚血性心疾患の発症は「心筋梗塞発症 + 明かな coronary intervention 有り + 24 時間以内の内因性急性死」で定義し、平均観察期間 13 年の中で、発

症件数は 126 例であった。

解析にあたり、non HDL は 160 mg/dL ~ 195 mg/dL の間で、LDL-C は 140mg/dL ~ 175 mg/dL の間で 5mg/dL 刻み (8 パターン) に 2 値化し、各々のカットオフ値における虚血性心疾患の発症との関連を Cox 比例ハザードモデルで評価した。なお、LDL-C 140mg/dL 以上をカットオフとした場合は日本動脈硬化学会基準 (以下 JAS 基準)、160mg/dL 以上をカットオフとした場合は ATP III 基準に相当する。Cox モデルの調整因子としては年齢・高血圧の有無・糖尿病の有無・HDL-C・BMI・現在喫煙・現在飲酒・性を用いた。また、各々の Cox モデルは赤池情報量基準 (AIC)、Bayes 情報量基準 (BIC) にて評価を行い、より適切なカットオフ値を探索した。なお、吹田研究は国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て遂行されている。

2 . 臨床検査学的検討

a) 検討 1 : LDL-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採血を行った成人被験者 (183 例) について、全例で総コレステロール (TC)、TG、LDL-C (LDL-C 直接法と BQ 法)、HDL-C (HDL-C 直接法と CDC 基準法) を測定した。測定済の検体は、キャップ付きのセラムチューブへ移し、京都府立医科大学検査部で、-20℃ で凍結して保存した。

LDL-C 直接法の試薬は、4 種類を用いた。これらの対象者において、性別、年齢、既往歴、服薬の有無、診断名、絶食時間を調査した。予め設定した基準に基づき、(1)胆汁うっ滞性肝疾患、(2)TG > 1,000mg/dL、(3) LDL-C < 20mg/dL、(4) HDL-C < 20mg/dL または 100mg/dL、(5)患者情報に欠損がある、のいずれかを満たす検体は解析から除外した。患者情

報と測定結果より、なんらかの疾病で治療中か、LDL-C > 160mg/dL または TG 200mg/dL の場合は疾患群に、いずれにも相当しない場合は健常群に分類した。

b) 検討 2：健常群および脂質異常症群における non HDL とアポ B の関係の検討

健常群と脂質異常症群から空腹時に採血し、すでに測定済みの TC と HDL-C の値を用いて、non HDL を計算した (= TC - HDL-C)。アポ B は免疫比濁法で測定した値を用いた。健常者における non HDL とアポ B の関係から回帰式を求め、WHO 分類の高脂血症型別に、健常群で認められた両者の関係が保たれているかどうか調べた。

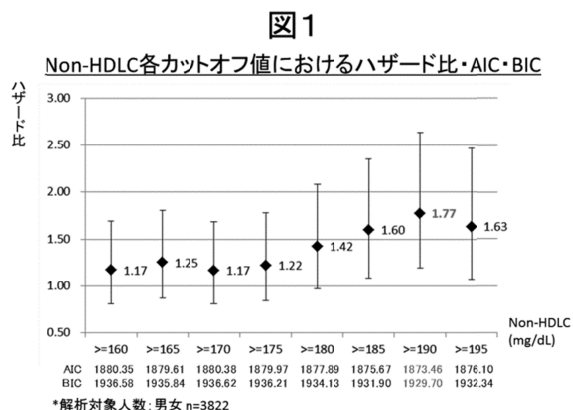
(倫理面への配慮)

無作為抽出した者のうち口頭による事前説明を行った後、書面での同意を得た者が本コホートの対象者である。また、本コホート研究は滋賀医大の倫理委員会の査定後、承認を得ている (No.17-19、No.17-83)。

C . 結果

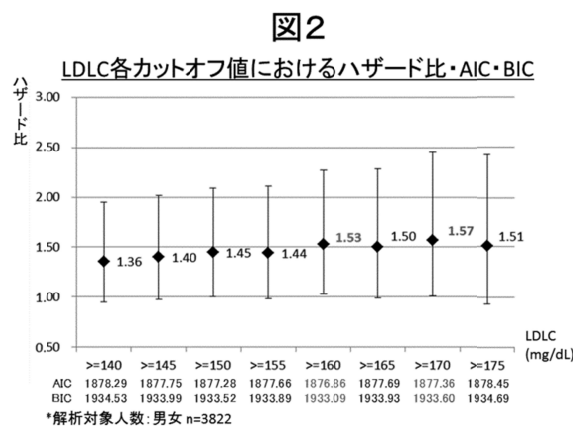
1 .疫学的検討：吹田研究における男女 3822 人中 CAD 発症者は 126 名であり、non HDL、LDL-C の各カットオフ値でのイベント発生数は 30 ~ 60 人と判断可能な人数が分布していた。

図 1 に non HDL 各カットオフ値における解析結果を示す。



non HDL 190 mg/dL 以上をカットオフ値とした場合、ハザード比 1.77 (95%信頼区間 1.20-2.63)、AIC: 1873.46、BIC: 1929.70 と他の 7 個のカットオフ値を用いた場合と比べて、統計学的に最もあてはまりのよい結果となった。

次に LDL-C 各カットオフ値における解析結果を図 2 示す。



LDL-C 160 mg/dL 以上をカットオフ値とした場合、ハザード比 1.53 (95%信頼区間 1.03-2.27)、AIC: 1876.86、BIC: 1933.09 と他の 7 個のカットオフ値に比べて、AIC・BIC では最も低い値となった。

3 . 臨床検査学的検討

a) 検討 1

収集した 183 検体のうち、あらかじめ定めた除外規定に該当したのは 15 検体であった。これらを対象から除いた残りの 168 例を、合

併する疾患や脂質異常症がない健常群 59 例と、これらを認める疾患群 109 例の 2 群に分けて、以下の解析を行った。

(1) LDL-C(直接法)と LDL-C(BQ法)の差の検討

検討した 4 社の試薬は、BQ 法に対する平均バイアスが、健常群で 0.04 ~ 0.61%、疾患群で 0.44 ~ 1.07%と非常に小さかった。

4 社の間には、その性能に大きな差はなかった。

(2) 空腹時および食後採血検体の比較

健常群では、59 検体中 43 検体(72.9%)が、疾患群では 109 検体中 47 検体(43.1%)が食後採血であった。いずれの試薬においても、直接法で測定した LDL-C と BQ 法で測定した LDL-C の関係はほぼ同じであった。

(3) 高 HDL-C 検体における LDL-C および HDL-C 直接法の試薬間差の検討

最後に、今回の検討では対象から除外された高 HDL-C 検体 (n=73) について、各社の LDL-C 直接法と HDL-C 直接法の値を比較した。CDC の基準法では、HDL-C < 110mg/dL が 2 例、110 ~ 150mg/dL が 2 例、150mg/dL

が 3 例であった。HDL-C 直接法で測定した HDL-C 値の試薬間差は、HDL-C < 110mg/dL では 10mg/dL 前後と小さかったが、HDL-C が 110 ~ 150mg/dL では 25 mg/dL 前後、HDL-C が 150mg/dL では 40 ~ 60mg/dL と著明に大きかった。胆汁うっ滞性肝疾患が疑われる 1 例では、HDL-C の試薬間差は 190 mg/dL 以上にも達した。これらの高 HDL-C 血症検体では、BQ 法で測定した LDL-C の値は 53 ~ 112mg/dL と正常範囲内だった。HDL-C < 110mg/dL の検体では、LDL-C 直接法の試薬間差は 10 mg/dL 未満しかなかったが、HDL-C が 110 ~ 150mg/dL の検体では、

LDL-C 直接法の試薬間差がほとんどなかったり、20 mg/dL くらいあったりとバラツキがあった。HDL-C が 150mg/dL では LDL-C 直接法の試薬間差は 20 ~ 40mg/dL と大きかった。胆汁うっ滞性肝疾患が疑われる 1 例では、LDL-C 直接法の試薬間差は 170mg/dL もあった。

b) 検討 2

最初に、健常者 199 名において、non HDL と ApoB の相関を調べた。両者の間には、有意な強い正の相関を認めた。($Y = 0.681X + 10.0$, $R = 0.958$, $p < 0.00001$)

次に、健常人における non HDL とアポ B の関係が、どの高脂血症の型にも当てはまるのか検討した。対象者を a 型、b 型、型、および 型高脂血症に分類し、non HDL を X 軸に、アポ B を Y 軸にとり、データをプロットした。健常者のデータから求めた回帰曲線を、これらのグラフに表示した。a 型と b 型では、健常群の回帰直線上にデータがほぼ分布していたが、型や 型では、大きく回帰直線から乖離するデータを認めた。型高脂血症のデータを、TG の値別にプロットしてみたところ、TG が 400mg/dL 未満では、ほぼ回帰直線上にデータを認めたが、TG が 600mg/dL 以上では、回帰直線から外れるデータが明らかに多くなった。TG がこの中間にある場合は、回帰直線に近いデータがある反面、大きく外れたデータもあった。

D . 考察

疫学的検討：本研究の結果から、虚血性心疾患発症に対する non HDL 185 ~ 195 mg/dL 以上 (ATP III 基準 $\pm 25 \sim 35$ mg/dL) が虚血性心疾患発症スクリーニングのためのカットオフ値として適当と考えられた。一方、non HDL と

同様の方法で LDL-C の最適カットオフ値を探索したところ 160 もしくは 170 mg/dL 以上 (ATP III 基準もしくは+10mg/dL) と考えられた。また、虚血性心疾患に対する non HDL と LDL-C の診断能は比較した場合、ほぼ同等か統計学的な有意差はつかないものの、non HDL の方がやや優れている事が示された。動脈硬化性疾患ガイドライン 2012 年版では、LDL-C と non HDL のスクリーニング基準は、それぞれ 140mg/dL、170mg/dL となっているが、これらは他の危険因子の評価も必要な要警戒域であり、コレステロール単独での治療を示唆する値ではない。実際、上記のガイドラインでも、他の危険因子を伴わない低リスク者(カテゴリー) の LDL-C と non HDL の管理目標値は、それぞれ 160mg/dL、190mg/dL であり、本研究で示されたカットオフ値とほぼ同じ値を示した。

わが国においても non HDL の有用性を示すエビデンスが蓄積されてきているが、それらのターゲットは高 TG 血症が前面に出てきている場合であり、動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版に示されているように、non HDL のわが国における位置づけは LDL-C の管理目標達成後の二次目標もしくは食後採血や TG 高値の場合の LDL-C の代替マーカーに過ぎない。本研究のように一般集団での虚血性心疾患の予測マーカーとしてプライマリーに non HDL のカットオフ値を評価した研究はほとんどなく、本研究において LDL-C と比較して non HDL の発症予測能が勝るとも劣らない結果となった事は、空腹時採血でなくても運用可能であり、構成要素である血清総コレステロールと HDL-C のわが国における測定精度が高いという測定上の利点と併せて、今後 LDL-C に代えて健診現場で non HDL を運用していくにあ

って大きな利点となると考えられる。

臨床検査学的検討：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ー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。既報の検討では、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Ⅱ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。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として胆汁うっ滞性肝疾患においても直接法が使用できないことが明らかとなり、その他の疾患群に関しても、さらに結論を出すことができる

と考えられる。

E . 結論

本研究の結果から

- 1、 non HDL は CAD 発症予測のスクリーニング検査として LDL-C に勝るとも劣らないマーカーであることが、国内コホート研究から明らかになった。
- 2、 non HDLC を 185 ~ 195 mg/dL 以上が、一般住民集団における虚血性心疾患発症スクリーニングのためのカットオフ値として適当と考えられ、その診断能はLDLCに勝るとも劣らないことが示された。
- 3、 LDL-C 直接法については、この間の研究から正確度の劣る試薬は市場から撤退もしくは改善され、ほぼ健常者の場合、食事に関係なく正確度は保証された。
- 4、 LDL-C 直接法は III 型、IV 型、V 型など著しい高 TG 血症では正確度が失われ、胆汁うっ滞性肝疾患でも正確度が保証されないなどの問題点があることが判明した。
- 5、 いっぽう、non HDL についても TG が 600mg/dl 以上では正確度が欠けることが判明し、留意すべきであることが判明した。
- 6、 以上のことから、特定健診において non HDL を検査項目として取り入れることは妥当と考えられた。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1)Ikeda Y, et al. Low-Dose Aspirin for Primary Prevention of Cardiovascular Events in Japanese Patients 60 Years or Older With Atherosclerotic Risk Factors. A Randomized Clinical Trial. JAMA 312(23):2510-20,2014
- 2)Hirose T, et al. Determinants of Bezafibrate-induced Improvements in LDL Cholesterol in Dyslipidemic Patients with Diabetes. J Atheroscler Thromb 22(7):676-684,2015
- 3)Nakamura M,et al. HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method. Clinica Chimica Acta. 439:185-190,2015
- 4)Nakamura M,et al. Total cholesterol performance of Abell-Levy-Brodie-Kendall reference measurement procedure: Certification of Japanese in-vitro diagnostic assay manufacturers through CDC's Cholesterol Reference Method Laboratory Network. Clinica Chimica Acta. 445:127-132,2015
- 5)Mohamed Mahdi Alshahni, et al. Genotyping of Acinetobacter baumannii strains isolated at a japanese hospital over five years using targeted next-generation sequencing. Journal of Infection and Chemotherapy. 21:512-515,2015
- 6)Gosho M, et al. Pitavastatin therapy in polymedicated patients is associated with a low risk of drug-drug interactions: analysis of real-world and phase 3 clinical trial data. Int. Journal of Clinical

Pharmacology and Therapeutics,
53(8):635-646,2015

H . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

