



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	汎用自動分析機を用いたHDL垂分画中のコレステロール定量測定法の開発に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	高橋, 祐司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第12374号
Issue Date	2016-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62477
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Takahashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学） 氏名：高橋 祐司

学位論文題名

汎用自動分析機を用いた HDL 亜分画中のコレステロール定量測定法の開発に関する研究

高比重リポタンパク質（high density lipoprotein: HDL）は、末梢組織のコレステロールを引き抜き肝臓へと輸送するコレステロール逆転送系を構成している。HDLがコレステロール逆転送系の重要な役割を担っていることから、HDL中のコレステロール（HDL-C）濃度が、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、発症予知に有用な指針となることが明らかにされている。HDLには、アポリポタンパク質E（apoE）の含量が高いもの（apoE-containing HDL）と、apoE含量が低いあるいは全く含まないもの（apoE-deficient HDL）に分類できる。ApoE-containing HDLはapoE-deficient HDLと比較し、肝臓におけるLDLレセプターやレムナントレセプターに高い親和性を持つことが報告されている。また、マクロファージからのコレステロール引抜き作用がapoE-deficient HDLよりも強く、抗血小板凝集作用もあることから、抗動脈硬化的作用があると考えられている。しかし、これまでのところapoE-containing HDLと動脈硬化との関係を疫学的に検証した報告はない。

ApoE-containing HDL-Cの測定には、総HDL-Cを測定する13%ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法と、apoE-deficient HDL-Cを測定するリンタングステン酸-デキストラン硫酸-マグネシウム（PT-DS-Mg⁺⁺）沈殿法の差分を、apoE-containing HDL-Cとして求める千葉らの方法（千葉法）が唯一のものである。しかしながら、千葉法は、沈殿剤を加えて遠心分離する操作があるため、多数の検体処理に適さないこと、自動化が難しいこと、低濃度の信頼性が保証されていないことなどから、臨床検査室で日常的に使用することは難しい。現在、臨床検査室で広く用いられているHDL-C定量法は、自動分析装置上で血清から直接に定量するHDL-C直接法（ホモジニアス法）と呼ばれる方法である。直接法はコレステロールオキシダーゼ等の酵素と界面活性剤を組み合わせることにより、前処理を行うことなく、HDLを特異的に測定することを可能としている。しかしながら、市販のHDL-C直接法はtotal HDL-Cの測定を目的としており、apoE-deficient HDL-CやapoE-containing HDL-Cを選択的に定量する直接法は存在していない。そのため、HDL亜分画に関する研究は従来の千葉法を用いるしかなく、大規模な疫学調査などには対応することが困難であった。

本研究では自動分析装置でHDL亜分画中のコレステロール測定を実現するために、界面活性剤を検索し、total HDL-C、apoE-deficient HDL-C、apoE-containing HDL-Cを同時に測定できる3試薬系試薬の開発を行い、さらに、測定装置の汎用性を考慮し、apoE-containing HDL-Cのみを測定できる2試薬系試薬の開発を行った。

第1章では、本研究の対象となるリポタンパク質の分類、高比重リポタンパク質（HDL）とコレステロール逆転送系の関係、高比重リポタンパク質の分類（apoE-deficient HDLと

apoE-containing HDL、HDL₂とHDL₃）、apoE-containing HDLの働き、apoE-containing HDLが増加する病態、高脂血症治療薬との関係、HDL-Cの測定法について、今までの研究により明らかとなっている特徴を説明し、本研究の背景と目的について記した。

第2章では、HDL 亜分画と選択的に反応し、かつ、他のリポタンパク質（VLDL、LDL）には反応しない界面活性剤を203種類から探索した。203種類の界面活性剤のうち99種類が、複数のリポタンパク質の中から選択的にHDL粒子を認識することを見いだした。また、99種類のうち15種類が主にapoE-deficient HDLのみと反応し、84種類がapoE-containing HDLを含めたtotal HDLと反応した。また84種類の中から、低濃度ではapoE-deficient HDLのみと反応し、高濃度ではapoE-containing HDLを含めたtotal HDLと反応する界面活性剤D201を見いだした。

第3章では、界面活性剤D201を用いて、D201の界面活性剤濃度を変化させ順次添加し、測光ポイントを適宜変えることで一度のサンプリングでtotal HDL-C、apoE-deficient HDL-C、apoE-containing HDL-Cを同時に定量することが可能な3試薬系の測定法の構築を行った。比較対照法として総HDL-C（total HDL-C）は13%ポリエチレングリコール法、apoE-deficient HDL-Cはリンタングステン酸-デキストラン硫酸-マグネシウム法を用いた。ApoE-containing HDL-Cは2種類の沈殿法の差から求める千葉法によった。新規に開発した3試薬系の測定法を用いて、肝機能異常のない健常者群サンプル（n=33、男性：女性=19：14、30-82歳、61±14（平均±SD）歳）で、比較対照法（x）と本法（y）の回帰式及び相関係数は、total HDL-C（ $y=0.966x+3.6051$ 、 $r=0.991$ ）、apoE-deficient HDL-C（ $y=0.9789x+1.2364$ 、 $r=0.987$ ）、apoE-containing HDL-C（ $y=1.0085x+3.774$ 、 $r=0.957$ ）であった。沈殿法との相関も良好であることから、本法が血清中のHDL 亜分画中のコレステロールを特異的に測定していることを支持する。また、3試薬系測定法により求めた、total HDL-C、apoE-deficient HDL-C、apoE-containing HDL-Cの関係をみると、total HDL-Cが100 mg/dlを超えると、apoE-containing HDL-Cの上昇が急になっていることから、各亜分画が異なる機序で制御されていることが示唆された。

第4章では、apoE-containing HDL-Cを簡便に測定できる方法として、2試薬系の測定法の構築を行った。新規に開発した2試薬系測定法を用いて、肝機能異常のない健常者群サンプル（n=61、男性：女性=25：36、18-88歳、60±18（平均±SD）歳）で、比較対照法（x）と本法（y）の回帰式及び相関係数は、apoE-containing HDL-C（ $y=0.6651x+2.1468$ 、 $r=0.805$ ）であった。臨床検体を用いた比較対照法との検討により、特異的にHDL 亜分画を測定していることが確認された。

第5章では、本研究の成果の要約と今後の展望について述べた。沈殿法では、HDL分画の分離に30分、コレステロール測定に10分必要であり計40～50分かかっていたものが、直接法（3試薬系・2試薬系）では約10分で測定が可能となった。ApoE-deficient HDL-CとapoE-containing HDL-Cの病態生理学的意義を明らかにするうえで大きな進歩である。これにより、これまで難しかった大規模な疫学調査などで、膨大なサンプルを処理することが容易となった。今後の展望として、本法は健常人や高脂血症患者のHDL組成の観点から、治療を行う有用なツールとして期待できる。HDLはコレステロール引き抜き作用以外にも、抗酸化作用、抗炎症作用、抗血栓作用などの様々な機能が報告されている。新しい血栓止血領域のバイオマーカーとしての活用や、抗血小板薬、抗凝固薬の開発へとつながる可能性もある。HDL亜分画の機能的側面を明らかにする方法の一助として、本研究の応用が期待される。