



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：高橋 祐司

審査委員	主査 教授	齋藤 健
	副査 教授	千葉 仁志
	副査 准教授	武田 晴治

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

当審査は平成 28 年 4 月 28 日実施の公開発表にて行われた。（出席者 16 名）

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）があり、その機能が異なることが知られている。

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直接法で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。

著者は、従来の測定法では、HDL亜分画の機能的な違いを明らかにするために必要な大規模な疫学調査に対応困難である状況を認識し、簡便な自動分析装置対応の直接法が必要であると考え、先行研究を踏まえたうえで、適切かつ独創的な研究目的を3つ設定していた。

第一の目的は、HDL 亜分画測定を測定する直接法に適した界面活性剤種の検索である。この目的に対し著者は、健常人の血清から HDL 亜分画を分離する方法を確立し、HDL 亜分画と 203 種類の界面活性剤を、著者が考案した選択性の指標 R を用いて分類した。これにより、特定の界面活性剤種の添加により HDL のみと反応し、また低濃度の添加では apoE-deficient HDL のみが反応し、高濃度では apoE-containing HDL を含めた全ての HDL が反応する界面活性剤 D201 を見いだした。界面活性剤の評価方法としては、数少ない報告しかないなかで、apoE に注目して反応性を分類したのは、本研究が初めてである。

第二の目的は、total HDL-C、apoE-deficient HDL-C、apoE-containing HDL-C を同時に測定できる 3 試薬系試薬の開発である。この目的に対し著者は、界面活性剤 D201 を用いて、そ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 試薬系の直接法の構築を行った。

構築した直接法は比較対照法との相関も良好であることから、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 試薬系直接法により求めた、total HDL-C、apoE-deficient HDL-C、apoE-containing HDL-C の関係を見ると、total HDL-C

が 100 mg/dl を超えると、亜分画のコレステロール濃度の増加率に差が認められ、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。本法が、健常人における HDL 亜分画を正確に評価し、その生理機能を明らかにする最初の方法だと言える。

第三の目的は、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 試薬系試薬の開発である。この目的に対し著者は、3 試薬系で用いた界面活性剤 D201 を用いて、第一反応で apoE-containing HDL 以外のリポタンパク質を消去し、第二反応で apoE-containing HDL コレステロールを測定することができる 2 試薬系の直接法を開発した。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。2 試薬系の試薬構成により、臨床での測定が容易となった。

以上のように、設定された目的に対し適切にデータを収集・処理し、個々の結果について図表を用いて詳細に解析が行われていた。

要するに、著者は、HDL亜分画測定法における界面活性剤種および濃度の反応性に関する新知見を得たものであり、これにより、汎用自動分析装置で簡便にHDL亜分画を測定できる直接法を開発した。従来の亜分画測定法では、約50分かかっていたものが、開発した直接法（3試薬系・2試薬系）では約10分で測定が可能となった。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。

本論文の成果は、HDL亜分画の病態生理学的意義を明らかにするうえで大変有用なツールを提供するものである。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、抗動脈硬化作用などの様々な機能が報告されている。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、応用が期待される。

本論文は、論理的に一貫した構成と内容で記述されており、高いレベルで完結性を有している。また、HDL に関する領域において国際水準での十分な学術的価値を有している。よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格があるものと認める。