HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［全文の要約］
Author(s)	髙橋, 祐司
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/62478
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Takahashi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）　氏名：髙橋　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

論文の構成は全5章からなり，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，HDL_2とHDL_3），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述している．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種類から探索する方法について記述している．第3章では，候補となる界面活性剤を用いて，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について記述している．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について記述している．第5章では，本研究の成果の要約と今後の展望について記述している．

緒言

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ーデキストラン硫酸ーマグネシウム（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．

対象と方法

健常人プール血清から超遠心法とポリエチレングリコール沈殿法を用いて，総HDL画分を分離し，ヘパリン・アフィニティクロマトグラフィーでapoE-containing HDL画分の分離を行った．

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．前述のスクリーニングにより候補となった界面活性剤D201を用いて界面活性剤濃度の検討を行った．

界面活性剤D201を用いて，3試薬系および2試薬系の測定法を構築し．肝機能異常のない健常者群サンプルを測定し，比較対照法と相関を確認した．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種類の沈澱法の差から求める千葉法によった．

結果

超遠心法とポリエチレングリコール沈殿法を用いて分離した総HDL画分は，HPLCで単一のピークとして確認された．得られた総HDL分画は，ヘパリン・アフィニティクロマトグラフィーによりapoE-deficient HDLとapoE-containing HDLに分離された．ApoE-containing HDLはcholesterol-richなものとcholesterol-poorなものが認められた．

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-containig 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．

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）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．新規に開発した2試薬系測定法も良好な相関性を示した．

3試薬系試薬により求めたapoE-containing HDL-Cは，total HDL-C<100 mg/dlまでは緩やかに増加しているが，total HDL-C>100 mg/dlになると急速に増加した．

考察

ヘパリン・アフィニティクロマトグラフィーの溶出フラクションは，コレステロールを多く含有するものと，コレステロール含量の少ないものの2種類が存在した．過去の研究においても，apoE-containing HDLには，脂質の多いapoE-containing HDL_2と脂質の少ないapoE-containing HDL_3があることが報告されており，今回の結果と一致していた．

界面活性剤の候補として，D201を選択したのは，apoE-deficient HDLとapoE-containing HDLの両者に反応する特徴を持っており，かつ他のリポタンパク質との非特異反応が少ないためである．3試薬系のHDL-C亜分画測定法には，apoE-deficient HDL-Cのみと反応する界面活性剤と，apoE-containing HDL-Cを含めたtotal HDL-Cと反応する界面活性剤の2種類が必要である．しかしながら，一つの測定系の中で異なる2種類の界面活性剤を併用した場合に，反応液中で界面活性剤同士が複合ミセルを形成し，期待する反応性とは異なる性質を反応液が持つ可能性がある．そこで，apoE-containing HDL-C を含むtotal HDL-Cを測定する界面活性剤のうち，界面活性剤の濃度を変化させるとapoE-containing HDL-Cとの反応性が変化するD201に注目した．

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試薬系の測定法が構築できた．また，測定対象をapoE-containing HDL-Cにしぼり，2試薬系測定法も開発した．沈殿法との相関も良好であることから，本法（3試薬系・2試薬系）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．

3試薬系により求めた，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，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．

本法（3試薬系・2試薬系）は，約10分でHDL亜分画中のコレステロール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り，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．

結論

本研究では，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，高濃度では全ての HDLが反応する界面活性剤を見いだした．この反応性を応用し，自動分析装置を用いて約10分でtotal HDL-C，apoE-deficient HDL-C，apoE-containig HDL-CのHDLコレステロール3分画を測定することが可能となった．また，apoE-containing HDL-Cを簡便に測定できる方法として，2試薬系の試薬構成も開発した．本試薬は，今後のHDL亜分画研究において，有用な測定法として用いることができる．