

〔 研 究 〕

HDL-コレステロール測定における 各種沈澱試薬の比較

松山赤十字病院 検査部

西山 政孝 高野 英樹

友近 徳子 古鎌しのぶ

HDL-コレステロール（以下HDL-C）測定法はアメリカのLipid Research Clinics¹⁾のヘパリン-Mn法に代表されるようにポリアニオンあるいはリンタングステン酸ナトリウムと2価陽イオンの組み合わせによる沈澱法が、その操作の簡便さから日常検査に用いられている。今回我々は、デキストラン硫酸-Mg沈澱法、デキストラン硫酸-リンタングステン酸-Mg沈澱法、デキストラン硫酸-ポリエリレングリコール-Mg沈澱法について比較検討したので報告する。

I 対 象

対象は健康管理センター受診者血清（健康者血清）、リウマチ因子（RF）陽性血清、Baxter製管理用血清モニターI、II Xとした。

II 方 法

a) 沈澱試薬

- A：デキストラン硫酸-Mg法（日本ケミファ）
 B：デキストラン硫酸リンタングステン酸-Mg法（ミズホ）
 C：デキストラン硫酸リンタングステン酸-Mg法（第一化学）
 D：デキストラン硫酸ポリエチレングリコール-Mg法（第一化学）

b) 測定方法

血清100 μ lに沈澱試薬100 μ lを混和攪拌後、冷却遠心器（4℃）にて3000回転10分遠心し、上清中コレステロールを測定した。なお、コレステロール測定試薬はデタミナーL TC（協和メデックス）を用い、日立7150形自動分析装置にて測定した。

III 成 績

1) 遠心時間による変動

沈澱試薬添加10分放置後の遠心時間を2.5、5、10、20、30分と変化させたところ、A～Dともに遠心時間の違いによるHDL-C値に差はみられなかった。

2) 遠心後の放置時間による変動

沈澱試薬添加後10分放置し、3000回転10分間遠心後60分放置したところ、A～Dともに60分まで変動はみられなかった。

3) 同時再現性の検討

HDL-C 23mg/dlの血清（n=10）ではAがCV=1.11%、Bが1.96、Cが1.67、Dが1.87、83mg/dlの血清ではAが0.92%、Bが0.57、Cが0.67、Dが0.59と良好な再現性を示した。

4) 高脂血症検体の分画能の検討

中性脂肪（TG）895mg/dlの検体ではAによるHDL-C値は35.9mg/dl、Bは29.7、Cは32.0、Dは29.1、TG 1010mg/dlではAは

40.6mg/dl、Bは33.7、Cは33.8、Dは31.7とAの分画能が他に比べ劣っていた。

5) 血清希釈液の違いによる変動

HDL-C 90mg/dlの血清を生食水と7%アルブミン液で希釈測定し、得られた値に希釈倍数を乗じてHDL-C値の変動を検討した。結果を図1に示す。希釈液に生食水を用いた場合、Aは2倍希釈で82.2mg/dl、5倍で58.0と希釈倍数が増すにしたがって著減し、B、Cも同様の傾向を示した。Dは2倍希釈で90.2mg/dl、3倍で89.4と3倍希釈まで変動はみられなかった。また、希釈液に7%アルブミン液を用いた場合、Aは2倍希釈で90.8mg/dl、5倍で93.5と変動はみられず、B、Cも同様の傾向だった。Dは2倍希釈で92.6mg/dl、5倍で96.5と希釈倍数が増すにしたがって漸増した。

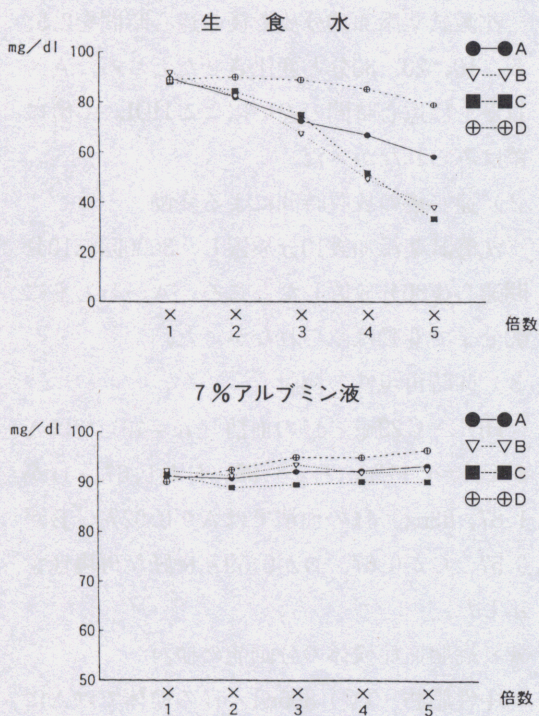


図1 血清希釈倍数の違いによる HDL-C値の変動

6) 各試薬間の相関

健常者血清32例及びRF陽性血清32例を対象に相関性を検討したところ、A~Dの間に相関係数0.99と良好な相関関係が得られた。

7) 56℃60分不活化前後の血清の相関

健常者及びRF陽性血清を対象に不活化前後のHDL-C値の相関を検討した。Aは、健常者及びRF陽性血清の不活化前後の相関係数が、0.92、0.71、Bは、0.96、0.93、Cでは、0.86、0.55と、健常者に比べRF陽性血清の相関が不良だった。一方、Dは健常者、RF陽性血清ともに0.99（健常者血清：回帰直線 $Y=0.98X-4.89$ 、RF陽性血清： $Y=1.01X-3.17$ ）と良好だった。

8) 血清不活化時間による変動

モニターI、II X、健常者、RF陽性血清を56℃で不活化し、HDL-C値の変動を検討した。結果を図2、3に示す。モニターI Xでは、Aは不活化5分後から急激に上昇し、Cは不活化15分後から漸増したが、B、Dには変動はみられなかった。モニターII Xでは、Aは不活化15分後から上昇し、B、Cは不活化5分後から漸減したが、Dには変動はみられなかった。健常者血清では、A~Dいずれも変動はみられなかった。RF陽性血清では、Aは不活化5分後から、Cは不活化10分後から上昇し、Bは不活化60分後で高値を示したが、Dには変動はみられなかった。また、モニターIでの変動がRF陽性血清に比べて大きかった。

9) 塩析後血清の不活化時間による変動

モニターI Xを塩析法（硫酸）によってr-グロブリン分画と上清分画に分け、各分画液を56℃にて不活化しHDL-C値の変動を検討した。結果を図4に示す。r-グロブリンを除いた上清分画（総蛋白濃度7.1

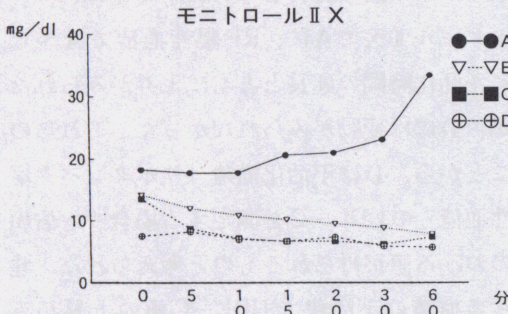
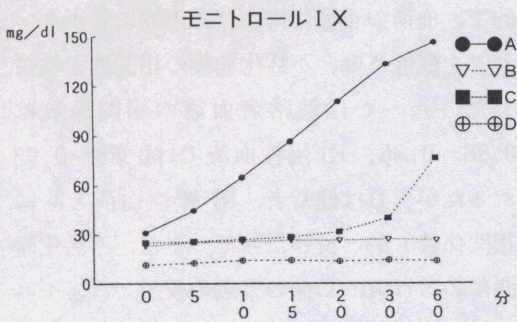


図2 血清不活時間の変化による HDL-C 値の変動

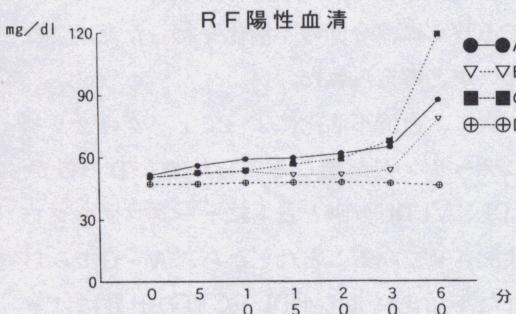
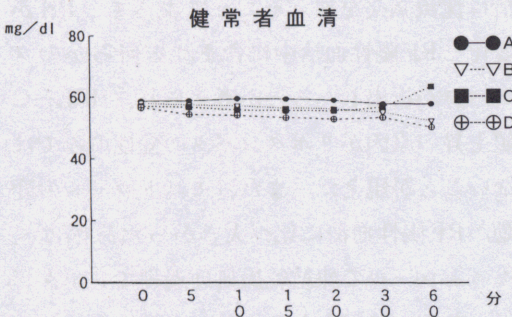


図3 血清不活時間の変化による HDL-C 値の変動

g/dl) ではAが不活化前31.9mg/dlから不活化60分後103.7、Cが不活化前26.7 mg/dlから不活化60分後95.1と著増した。Dは不活化前14.7mg/dlから不活化60分後7.9と漸減した。なお、Bには変動はみられなかった。r-グロブリン分画(総蛋白濃度2.8g/dl)ではA~Dいずれも変動はみられなかった。

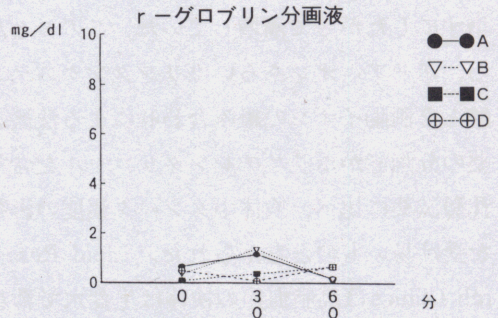
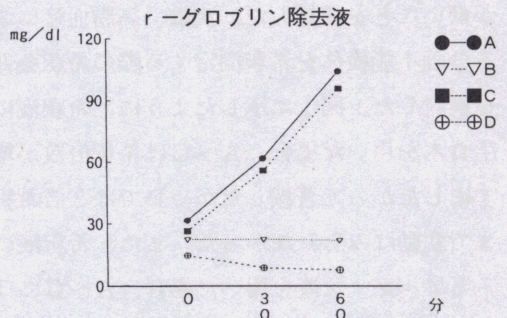


図4 r-グロブリン分画、除去液の不活時間の変化による HDL-C 値の変動

IV 考 察

HDL分画用試薬は種々なポリアニオンあるいはリンタンクスチレン酸ナトリウムと2価の陽イオンを組み合わせた沈澱法が、操作の簡便さから日常検査として広く用いられている。今回我々は、デキストラン硫酸-Mg沈澱法(A)、デキストラン硫酸リンタンクスチレン酸-Mg(B、C)、デキストラン硫酸ポ

リエチレングリコール-Mg (D) の比較検討を行った。沈澱試薬添加後の遠心時間は、A~Dとも3000回転、2.5分で沈澱効果は十分であり、遠心後は60分放置でもHDL-C値に変動はみられなかった。同時再現性はA~Dともに良好だった。高脂血症検体の分画能の検討では、TG 1000mg/dlを越える検体で、Aの分画能が他に比べ劣っており、デキストラン硫酸のみを用いた沈澱試薬の分画能が低いことを確認した。次に、高脂血症による分画不能検体を希釈測定する際の希釈条件を検討した。図1に示したように、希釈液に生食水を用いた場合、A~Cは希釈倍数が増すにしたがって著減したが、Dでは3倍希釈まで変動はみられなかった。また、希釈液に7%アルブミン液を用いた場合、A~Cには変動がみられなかったが、Dでは希釈倍数が増すにしたがって漸増していた。このことから、ポリアニオンあるいはリンタンングステン酸と2価陽イオンの組み合わせによる沈澱試薬の分画能がポリエチレングリコールを含む沈澱試薬に比べ、検体中タンパク濃度の影響を受け易いものと考えられた。Lipid Research Clinicsは高脂血症の検体は生食水で希釈すると述べているが²⁾、我々の検討ではポリアニオンあるいはリンタンングステン酸と2価陽イオンの組み合わせによる沈澱試薬は検体を7%アルブミン液で希釈し、ポリエチレングリコールを含む沈澱試薬は検体を生食水で3倍希釈以内にとどめて測定するのが望ましいと考えられた。

最近、凍結乾燥管理血清のHDL-C値が、沈澱試薬の種類によって乖離することが報告されており、その原因はリポタンパクの変性にあると考えられている³⁾。そこで、リポタンパク変性血清のHDL-Cを測定する場合

に、いずれの沈澱法が優れているかを知る目的で、血清の不活化により人工的にリポタンパクを変性させ、不活化前後の相関性を検討した。A~Cは健常者血清の相関係数は0.86~0.96、RF陽性血清では0.55~0.93だったが、Dは健常者、RF陽性血清ともに相関係数0.99と良好だった。また、不活化時間によるHDL-C値の変動の検討では、モニターI XでA、CのHDL-C値に、モニターII XでAに、RF陽性血清でA~Cに不活化時間の延長とともに上昇がみられたが、Dには変動がみられなかった。これらのことから、Dは不活化血清(リポタンパク変性血清)のHDL-Cを測定する場合でも信頼のおける値が得られるものと考えられた。健常者血清の不活化でHDL-C値の上昇がみられず、RF陽性血清の不活化で上昇がみられた原因については、遠心沈澱後の上清分画が乳びしていたことから、60分不活化した血清に沈澱試薬を加えることによって、PHが変化しRF陽性血清中に含まれる何らかのタンパクが析出したことが考えられ、HDL-C値上昇の原因がリポタンパクの変性のみではないことが窺えた。また、モニターの変動がRF陽性血清に比べ大きかった原因は、モニターの変動がRF陽性血清に比べ大きかった原因は、モニターの凍結乾燥処理過程でリポタンパクあるいは何らかのタンパク変性が起こってるうえに、今回の不活化を行ったためではないかと考えられた。

次に、血清不活化によって α_2 -グロブリンにテーリングが起ること⁴⁾や、DのみがLDL、VLDL分画とともに α_2 -グロブリンを共沈させていることなどから、A~Cでみられた不活化によるHDL-C値の上昇には α_2 -グロブリンも関与しているのではないかと考えられた。そこで、塩析法によってモニター

ロールIXのr-グロブリンを除去し、r-グロブリン除去分画とr-グロブリン分画をおのおの不活化した。図4に示したように、r-グロブリン除去分画では不活化60分でA、CにおいてHDL-C値の著増がみられたが、r-グロブリン分画では変動はみられなかった。このことから、不活化によるHDL-C値の上昇にr-グロブリンが関与するという考えは否定された。

V 結 語

HDL-C測定における各種沈澱試薬の比較検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) A～Dいずれも遠心沈澱時間は3000回転、2.5分で十分だった。
- 2) A～Dいずれも遠心後60分放置までHDL-C値に変動はみられなかった。
- 3) TG1000mg/dlでAの分画能が、他に比べ劣っていた。
- 4) 分画不能検体を希釈測定する場合、A～Cは検体を7%アルブミン液で希釈し、Dは生食水で3倍希釈以内にとどめて測定するのが望ましい。
- 5) 血清不活化前後の相関係数はA～Cで低下したが、Dは相関係数0.99と良好だった。
- 6) 不活化血清あるいはリポタンパク変性血清のHDL-Cを測定する場合は、ポリエチレングリコールを含む沈澱試薬(D)を用いるのが望ましい。

文 献

- 1) 内藤周幸 訳：アメリカにおける血漿脂質ならびにリポ蛋白測定法の標準化・医学のあゆみ、94：359～362、1975
- 2) 信岡 学：HDL-コレステロール・Medical Technology、13：294～299、1985
- 3) 内田宏美、ほか：凍結乾燥管理血清のHDL-コレステロールの比較・医学検査、43：607、1994
- 4) 山岸安子：血清タンパク分画用検体の保存・Medical Technology 別冊臨床検査Q & A170、153～154、医歯薬出版株式会社、東京、1990