

〔 研究 〕

HDL—コレステロール 直接測定法試薬の評価

松山赤十字病院 検査部
高野 英樹

はじめに

高比重リポ蛋白コレステロール（以下HDL-C）の測定にはポリアニオンと2価の陽イオン金属の組合せによる沈澱法が、日常検査に広く用いられている。しかし、沈澱法は遠心分離の必要性から自動分析装置への適応は不可能であった。近年、化学修飾酵素及び硫酸化シクロデキストリン（以下CyD）を用いることにより分画操作を要せず、完全自動化の可能なHDL-Cを直接測定する試薬が開発された。そこで我々は、化学修飾酵素、CyDを用いたHDL-C直接測定法（以下直接法）の評価を行ったので報告する。

I 対象

対象は、健康管理センター受診者血清（健康者血清）、外来患者血清（高脂血清）とした。

II 方法

HDL-C測定法の直接法はデタミナーHDL-C（協和メデックス）、沈澱法は遠心分離後に上澄み中のコレステロールをデタミナーLTC（協和メデックス）を用い、日立7150自動分析装置にて測定した。

III 成績

(1)タイムコースの検討

健康者血清、高脂血清、沈澱法でHDL外のリポタンパクを沈めた上澄み液（以下上澄み液）のタイムコースの検討をした。結果を図1、2に示す。直接法は健康者血清、高脂血清で10分後でもエンドポイントに達しなかったが、上澄み液ではエンドポイントに達した。沈澱法では健康者血清、高脂血清共に直接法に比べ反応が速くエンドポイントに達した。

(2)直接法と沈澱法の相関

健康者血清32例（TG平均115.2mg/dl）を対象に直接法と沈澱法の相関性の検討をした。結果を図3に示す。相関係数0.99、回帰直線 $y = 0.90x + 11.7$ と良好な相関が得られたが、切片が11.7となり直接法が有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）。

(3)高脂血清の検討

TGが400mg/dl以上、T-CHOが300mg/dl以上の検体25例（TG平均516.3mg/dl）を対象に直接法と沈澱法との相関性の検討をした。結果を図4に示す。相関係数0.94、回帰直線 $y = 0.81x + 30.3$ と有意な相関は得られたが（ $p < 0.05$ ）、高TG血清においては直接法の測定値が沈澱法に比べ有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）。直接法で高値を示した検体を検索したところ糖尿病11例、ネフローゼ3例で

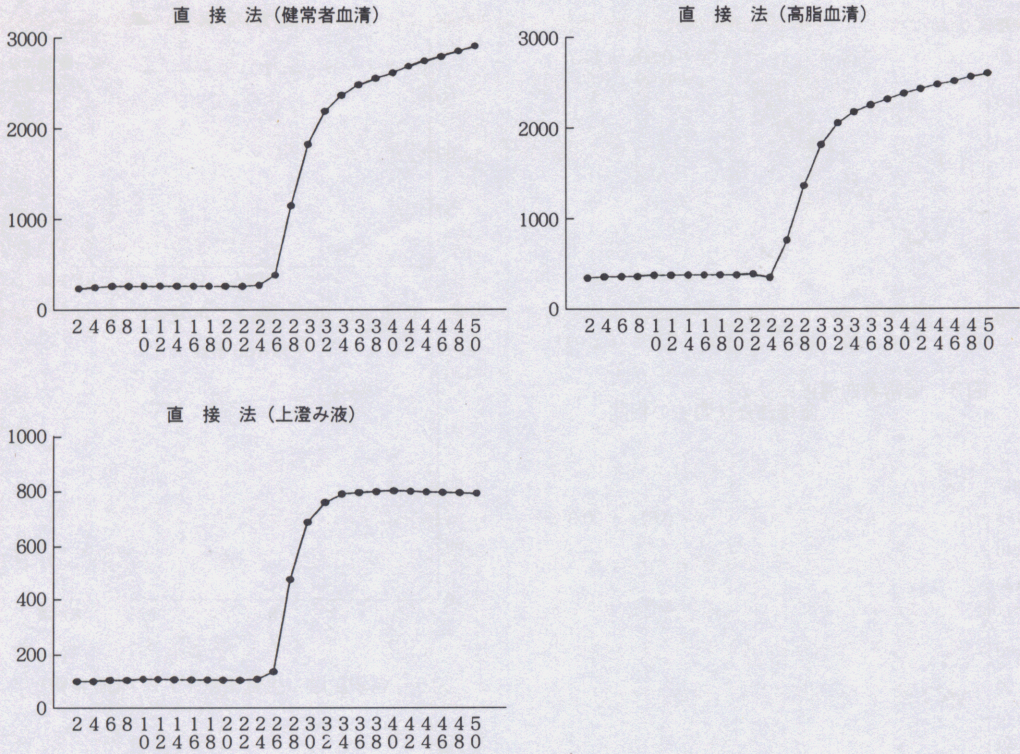


図1 直接法のタイムコース

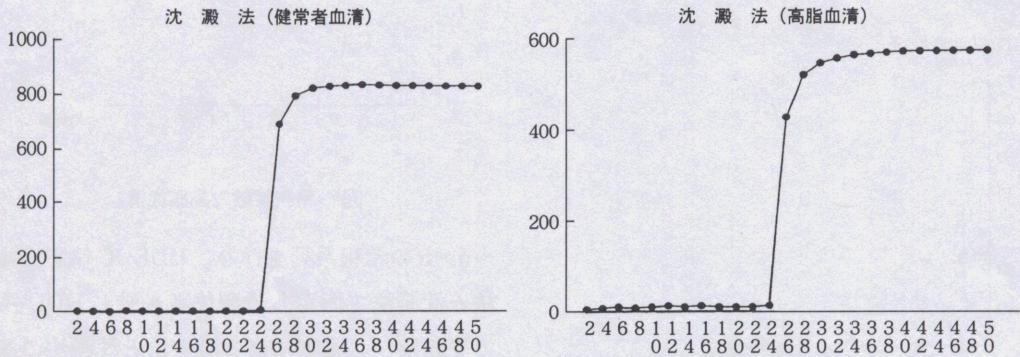


図2 沈澱法のタイムコース

あった。次にTG濃度と直接法、沈澱法の測定値の差との関係を検討した。結果を図5に示す。両者の関係は相関係数0.78と有意な相関を示し ($p < 0.05$)、TG濃度が高値になるに従い、直接法と沈澱法との測定値差は大きくなった。

(4)希釈試験

(a)検体を生食及び7%アルブミン液で希釈率1/5~5/5の希釈系列を作りHDL-Cを直接法と沈澱法で測定し、希釈倍数を乗じそれぞれのHDL-C値の変動を検討した。結果を図6に示す。生食希釈(希釈率1/5、5/5)で

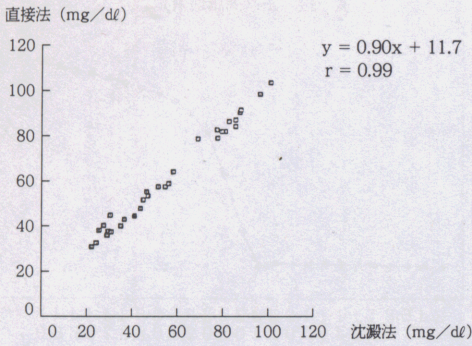


図3 健常者血清における直接法と沈澱法の相関

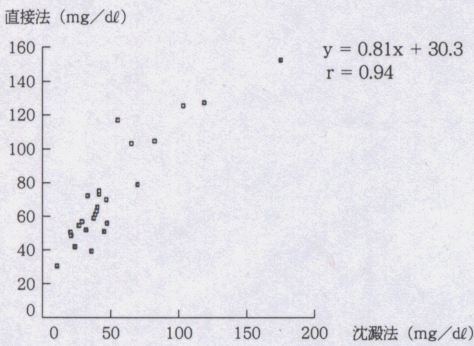


図4 高脂血清における直接法と沈澱法の相関

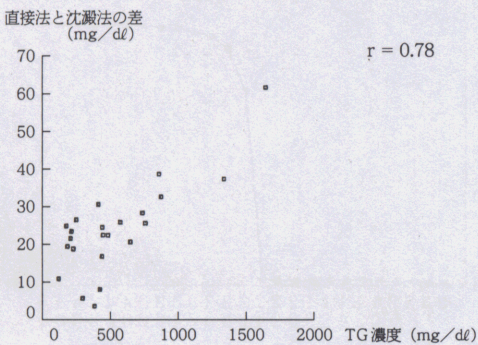


図5 直接法・沈澱法の測定値差とTG濃度の相関

は直接法109.0、105.5mg/dℓ、沈澱法106.5、112.9mg/dℓで、7% ALB希釈（希釈率1/5、5/5）では直接法113.0、105.0mg/dℓ、沈澱法108.0、112.9mg/dℓといずれも大きな変動はみられなかった。

(b)高TG検体（1200mg/dℓ）を生食で1/5

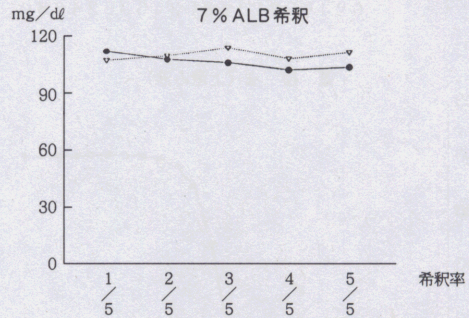
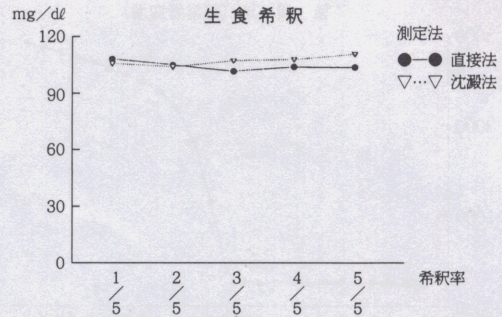


図6 希釈試験（生食希釈、7% ALB希釈）

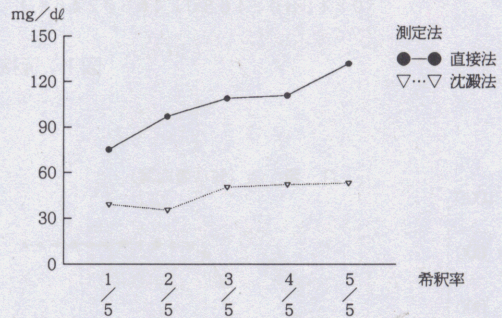


図7 希釈試験（高脂血清）

～5/5の希釈系列を作り、HDL-C値を直接法と沈澱法で測定し希釈倍数を乗じHDL-Cの変動及び、希釈による直接法と沈澱法の測定値の比較をした。結果を図7に示す。沈澱法では希釈率1/5～5/5でHDL-C値が41.5、37.8、53.0、54.8、55.4mg/dℓとなり、希釈率3/5～5/5においてHDL-Cの希釈による影響はみられなかった。直接法は希釈率1/5～5/5で77.5、99.0、111.0、112.9、133.6mg/dℓとHDL-C値は変動し、希釈倍数が増すにつれHDL-C値は漸減傾向を示した。

沈澱法の測定値に最も近づいた希釈率1/5 (5倍希釈)でも、沈澱法(希釈率5/5)との差が22.1mg/dlみられた。

(c)高HDL-C検体(沈澱法191.2mg/dl)を生食で1/5~5/5の希釈系列を作り、直接法と沈澱法の直線性の検討をした。結果を図8に示す。沈澱法では191mg/dlまで、直接法では103.5mg/dl(希釈率3/5)まで直線性が得られた。

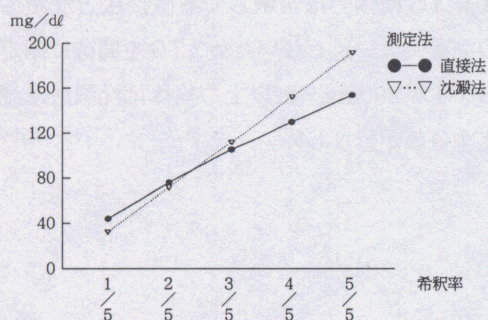


図8 希釈直線性 (高HDL血清)

IV 考 察

近年、遠心分離を要せず、完全自動化が可能なHDL-Cを直接測定する試薬が開発された。そこで我々は、HDL-C測定における直接法の評価を沈澱法を対照に行なった。まず、直接法と沈澱法のタイムコースの検討を行なった。図1、2に示したように直接法では、健常者血清、高脂血清ともに反応はエンドポイントに達していなかったが、上澄み液では反応はエンドポイントに達していた。この原因はCyDでブロックしたLDL、VLDL-CHOにコレステロールエステラーゼが反応しているためと考えられた。次に、直接法と沈澱法の相関性の検討を行なった。図3に示したように両者は良好な相関($\gamma = 0.99$)を示したが、回帰直線の切片が11.7mg/dlと大きく直接法が沈澱法に比べ有意に高値を示した($p < 0.05$)。この原

因は、直接法でタイムコースがエンドポイントに達していないことからVLDL、LDL-Cにコレステロールエステラーゼが反応していること、直接法のスタンダードを超遠心法で値付けしていることに起因すると考えられ、直接法で測定する場合には正常参考値を設定し直す必要があることが示唆された。高脂血清での相関は図4に示したように良好な相関($\gamma = 0.94$)を示したが、回帰直線の切片が30.3mg/dlと大きく直接法が沈澱法に比べ有意に高値を示した($p < 0.05$)。直接法と沈澱法の測定値差の大きかった検体を検索したところ糖尿病(11例)が最も多く、ネフローゼ(3例)などがみられた。この原因は、糖尿病は脂質代謝異常、ネフローゼは高脂血漿と共に高脂血漿を伴う疾患であるためと考えられた。直接法と沈澱法の測定値の差とTG濃度の関係は、図5に示したように相関係数0.78で有意な相関があり($p < 0.05$)、TG濃度の高い検体ほど測定値差が大きい傾向にあった。この原因は高脂検体ではTG濃度が高値なほどCyDによってブロックできないLDL、VLDL-CHOが多くなるためと考えられた。添付文書ではTGが800mg/dl以上の検体は希釈して測定する必要があると報告している。そこで、高脂血清(TG1200mg/dl)を生食で希釈系列(1/5~5/5)を作り直接法と沈澱法で測定し、希釈操作で測定値が一致するかを検討した。図7に示したように沈澱法では希釈率3/5~5/5で希釈による影響はみられなかったが、直接法では希釈倍数が増すにつれHDL-C値は漸減傾向を示した。直接法と沈澱法との測定値差はTG800mg/dl以下(希釈率3/5、TG720mg/dl)で55.6mg/dlの測定値差があり、最も近づいた希釈率1/5(TG240mg/dl)でも直接法と沈澱法(希釈

率5/5)との差は22.1mg/dlであった。以上のことから、現時点ではHDL-C測定に直接法を用いる場合にはTGを同時に測定する必要があり、TGが高値(200mg/dl以上)の検体は希釈操作で正しい測定値が得られないことから、沈澱法で測定するのが望ましいと考えられた。

V 結 語

HDL-C測定における化学修飾酵素及びCyDを用いた直接法の評価を行い以下の結果を得た。

(1)タイムコースは直接法では健常者血清、高脂血清ともエンドポイントに達していなかつ

た。

(2)直接法と沈澱法の相関は良好であったが、回帰直線の切片が11.7mg/dlで直接法が有意に高値を示し、直接法で測定する場合には、正常参考値の再設定が必要となった。

(3)高脂血清(TG400mg/dl以上)でも相関は良好であったが、回帰直線の切片が30.3mg/dlと大きく直接法で有意に高値を示した。

(4)高TG検体では希釈しても直接法と沈澱法の測定値は一致しないため、TGを同時に測定しTGが200mg/dl以上の検体は沈澱法で測定するのが望ましい。