

# Small, dense LDL コレステロール測定試薬の有用性の検討

大井 愛花 齋川 健志 関本 正泰 二本柳 洋志  
石幡 哲也 齋藤 市弘 山本 肇 高田 直樹

一般財団法人竹田健康財団竹田総合病院臨床検査科(〒965-8585 福島県会津若松市山鹿町 3-27)

sd LDL-C 測定は冠動脈疾患のリスク評価に重要である。汎用生化学自動分析機による sd LDL-EX 「生研」の基礎的検討を行った。同時再現性は CV 0.55~0.67%，日差再現性は 1.59~3.21%であった。希釈直線性は 100mg/dL まで原点を通る直線性が認められた。共存物質の影響は認められなかった。sd LDL-C 値の比較では健常者に比べて心血管イベントおよび脳血管疾患の患者は sd LDL-C, sd LDL-C/LDL-C 比ともに高値を示し、動脈硬化リスク判定に有用であることが示唆された。基本性能は良好で日常検査において有用であると考えられる。

キーワード：small, dense LDL コレステロール(sd LDL-C) 生化学汎用自動分析装置

## 【緒言】

低比重リポ蛋白(low-density lipoprotein; LDL)は、肝臓由来のコレステロールを末梢へ運搬する役割を担っており、過剰に増加することで動脈硬化性硬化疾患の原因となるため、LDL中に含まれるコレステロール量を示す LDL コレステロール(LDL-C)は、心筋梗塞や脳梗塞などに代表される種々の動脈硬化性疾患のリスク評価に用いられてきた。しかしながら、近年 LDL-C が正常であっても冠動脈疾患を発症する場合があります。リスク因子としては感度が低いことが相次いで報告された。近年、LDL の亜分画に関する研究により、LDL の中でも粒子が小さく、比重が大きい small, dense LDL(sd LDL)が動脈硬化を惹起しやすいことが明らかとなった。また、コホート研究により sd LDL-C が冠動脈疾患(CAD)・心血管イベント(CVD)の強力な独立した危険因子であることが報告された<sup>1, 2, 3, 4)</sup>。

sd LDL は LDL 受容体に対する親和性が低いために血中滞在時間が長く、小型のため血管内皮に侵入しやすい。また、sd LDL コレステロール(sd LDL-C)は酸化ストレスに対する抵抗性が低いことから血管外でマクロファージの貪食を受けやすく、結果として動脈硬化性病変の形成を容易にする。以上のことから、血清中の sd LDL-C 測定は冠動脈疾患のリスク評価に重要である。

今回我々は、生化学汎用自動分析装置に搭載可能で sd LDL-C を直接測定可能な試薬 sd LDL-EX 「生研」の基礎性能を評価する機会を得たので報告する。

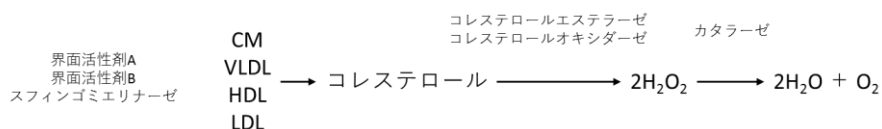
## 【方法および対象】

### 1. 機器および試薬

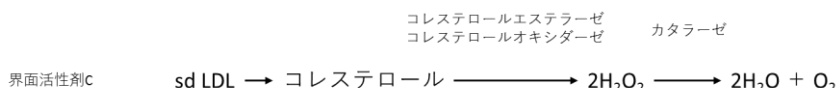
sd LDL-C 測定試薬：sd LDL-EX 「生研」(デンカ生研株式会社)、検量物質：脂質キャリブレーター D (デンカ生研株式会社)、機器：TBA-c16000(キャノンメディカルシステムズ株式会社)を用いた。  
LDL-C 測定試薬：コレステスト LDL(積水メディカル株式会社)を用いた。

Figure.1 測定原理

第1反応 sd LDL以外のリポ蛋白中コレステロール消去



第2反応 sd LDLコレステロールの測定



## 2.測定原理

LDL-C 直接法の原理を応用したものである。LDL-C 直接法では第1反応で HDL-C や VLDL-C を界面活性剤により消去し，第2反応で残った LDL-C を測定する。今回用いた sd LDL-EX「生研」ではさらに Large LDL-C を消去するために，第1試薬にスフィンゴミエリナーゼを添加する。これにより sd LDL-C のみを残し測定を行う<sup>3)</sup>(Figure.1)。

## 3.対象

当院臨床検査科ボランティア 18 名(平均年齢 35 歳)，および心筋梗塞，大動脈解離，狭心症などの心血管イベントにて救急室を受診した患者 12 名(平均年齢 70 歳)，脳梗塞，脳出血，くも膜下出血などの脳血管疾患にて救急室を受診した患者 23 名(平均年齢 81 歳)の残余血清を用いた。sd LDL-C は TG の増加に関連して高値を示す割合が多いため，動脈硬化性疾患予防ガイドラインの脂質異常診断基準にて脂質異常とされるものを除外した。また，生活習慣病に関連が深いため，糖尿病患者，生活習慣関連の疾患を併発している患者，投薬患者を除外した。

患者検体の使用にあたっては，包括同意を得ており，個人情報はずべて連結不可能匿名化を行った。ボランティアからの検体提供は事前にインフォームドコンセントを実施した。本研究は，筆頭著者の所属施設である竹田総合病院倫理委員会の承認のもとに実施した。

### 【検討内容および結果】

#### 1.同時再現性および日差再現性

低，高 2 濃度の sd LDL コントロール（デンカ生研株式会社）を用い再現性の検討を行った。連続 10 回測定した同時再現性は CV 0.55~0.67%，連続 14 日間測定した日差再現性は CV 1.59~3.21%であった(Table.1)。

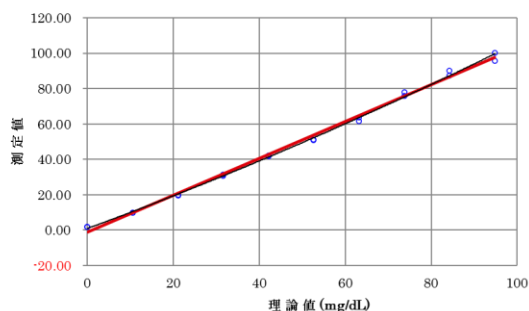
#### 2.希釈直線性

高濃度試料を希釈専用溶液で 10 段階希釈を行ったところ，100mg/dL まで原点を通る良好な直線性が認められた(Figure.2)

Table.1

(A)同時再現性			(B)日差再現性		
	コントロールL (17.6mg/dL)	コントロールH (52.6mg/dL)		コントロールL (17.6mg/dL)	コントロールH (52.6mg/dL)
Average	18.6	51.2	Average	18.0	50.7
SD	0.13	0.28	SD	0.58	0.81
CV(%)	0.67	0.55	CV(%)	3.21	1.59

Figure.2 希釈直線性



### 3. 共存物質の影響

プール血清に干渉チェック・A プラス(シスメックス株式会社)を添加し、測定値に結果を及ぼす可能性がある共存物質を濃度依存的に評価した。その結果、間接型ビリルビン (Bil-F) は 19.0mg/dL, 直接型ビリルビン (Bil-C) は 20.8mg/dL, 溶血ヘモグロビンは 460mg/dL, 乳びは 1603ホルマジン濁度, アスコルビン酸は 50.0mg/dL まで、測定値へ影響を与えなかった(Figure.3).

### 4. sd LDL-C 値の比較

健常者 18 名, 心血管イベント患者 12 名, 脳血管疾患患者 23 名の sd LDL-C 値と sd LDL-C/LDL-C 比の比較をした。有意差検定 Mann-Whitney 検定を用い,  $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。健常者では sd LDL-C 平均値  $\pm$  SD は  $16.2 \pm 11.6$ mg/dL, sd LDL-C/LDL-C 比は 14.6%, 心血管イベントの患者では sd LDL-C(平均値  $\pm$  SD)は  $25.7 \pm 11.9$ mg/dL, sd LDL-C/LDL-C 比は 26.8%, 脳血管疾患の患者では sd LDL-C(平均値  $\pm$  SD)は  $22.1 \pm 12.2$ mg/dL, sd LDL-C/LDL-C 比は 23.0%であった。健常者に比べ, 心血管イベントおよび脳血管疾患の患者は sd LDL-C, sd LDL-C/LDL-C 比ともに有意に高値を示した( $p < 0.05$ )(Figure.4).

### 【考察】

Sd LDL は動脈硬化や心筋梗塞のリスクを予測する鋭敏な指標になることが確認されている。従来の sd LDL-C 測定法である超遠心法, 電気泳動法, フィルター法<sup>6)</sup>などは, 特定の分析装置が必要であり, 測定にも長時間を要するため, 日常検査に用いるのが困難であった。今回検討を行った sd LDL-EX「生研」は直接法を利用しており, 生化学汎用自動分析装置に搭載可能であり, 前処理を必要とせずわずか 10 分で測定が可能である。

検討結果は, 同時再現性, 日差再現性, 希釈直線性および共存物質の影響ともに良好な結果が得られた。sd LDL-C 値の比較においては, 健常者に比べて心血管イベントおよび脳血管疾患の患者は sd LDL-C, sd LDL-C/LDL-C 比ともに高値を示した。今回は心血管イベント, 脳血管疾患との関連を明らかにするために, 生活習慣関連疾患の既往を除外した。その結果, 対象者が限定されたこと, 対象者の年齢に大きな差が出てしまったことから, それらによる影響を受けてしまった可能性がある。一方で, 既報では, 年齢差によらず疾患により sd LDL-C 値に有意な差を認めた報告<sup>7)</sup>も

Figure.3 干渉物質の影響

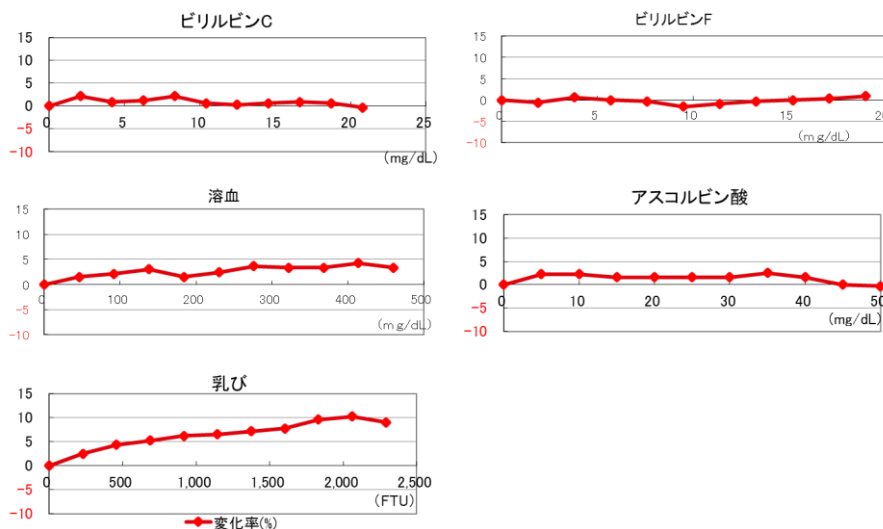
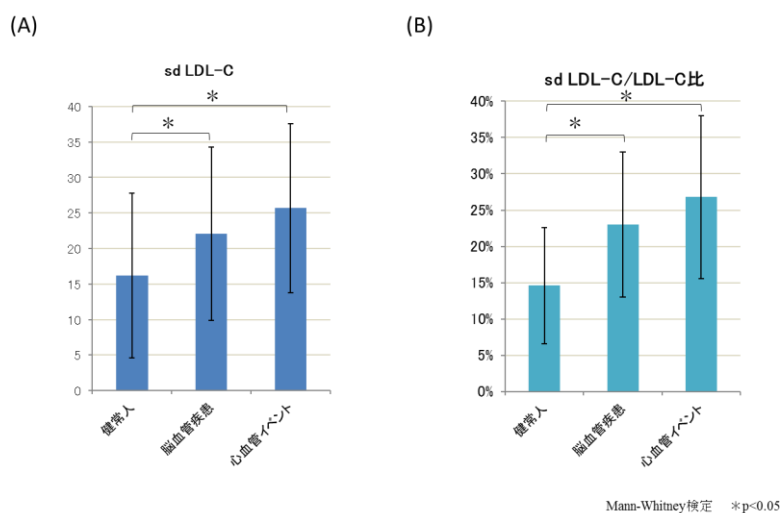


Figure.4 sd LDL-C値の比較



あることから、今後年齢を調整したうえでの更なる症例の追加などの検討が必要であると考えられる。

### 【結語】

今回 sd LDL-C 測定試薬の試薬性能試験を行ったところ、いずれも基本性能は良好であり、sd LDL-EX「生研」は日常検査において有用であると考えられた。sd LDL-C 値の比較では健常者に比べて心血管イベントおよび脳血管疾患の患者は sd LDL-C、sd LDL-C/LDL-C 比ともに高値を示したことから、冠動脈疾患において sd LDL-C が有用であることが示唆された。今後さらに、症例数を増やし有用性を検討していきたい。

本論文は、第 51 回福島医学検査学会(2019 年 5 月郡山市)における報告の内容と同意である。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

### 【参考文献】

- 1) Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Low-Density Lipoprotein Subclass Patterns and Risk of Myocardial Infarction. JAMA. 1917-1921, 1988.
- 2) Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, et al. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Off spring Study. Clin Chem. 967-976, 2010.
- 3) Ito Y, Fujimura M, Ohta M, et al. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. Clin Chem. 57-65, 2011.
- 4) 平野 勉：脂質検査項目 Small dense LDL, Medical Technology. 127-131, 2009.
- 5) 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版. 日本動脈硬化学会. 2017.
- 6) 伊藤康樹, 平野 勉, 芳野原：フィルター法による Small dense LDL コレステロール測定法の特徴及び性能. 臨床化学. 240-247, 2005.
- 7) Arai H, et al. Small dense low density lipoproteins cholesterol can predict incident cardiovascular disease in an urban Japanese cohort: the Suita study. J Atheroscler Thromb. 195-203, 2013.