

JCCLS 協議申請文書 (草案)

## I-(2) HDL-C 日常測定法評価のための比較法

—デキストラン硫酸-Mg<sup>2+</sup>/コレステロールデヒドロゲナーゼ法—

## A Comparison Method of HDL-Cholesterol Measurement for Evaluation of Routine Methods

— Dextran Sulfate-Magnesium/Cholesterol Dehydrogenase Method —

日本臨床検査医学会 標準委員会

脂質・リポ蛋白ワーキンググループ

Japanese Society of Laboratory Medicine Working Group on Lipids Lipoproteins

## HDL-C 日常測定法評価のための比較法

### —デキストラン硫酸-Mg<sup>2+</sup>/コレステロールデヒドロゲナーゼ法—

日本臨床検査医学会 標準委員会  
脂質・リポ蛋白ワーキンググループ

[Rinsho Byori 50 : 93~99, 2002]

#### I. はじめに

高密度リポタンパクコレステロール(HDL-C)の濃度低下は冠状動脈疾患発症等の危険性増大に関連しているため、臨床検査では重要な項目の一つである<sup>1)</sup>。

近年、HDL-Cの直接測定法<sup>2)</sup>が開発され、伝統的な沈殿法に置き換わって広く用いられるようになりつつある。同一検体を種々の沈殿法で測定してみると、沈殿法ごとに異なる値が得られることがあるが、同じ現象が直接測定法についても報告されている<sup>2)</sup>。このように、HDL-Cの測定値が測定法によってばらつくのを避けるため、「正確さの道しるべ」としてのレファレンス法(実用基準法)または比較法の確立が、我が国で求められている。

現在国際的に認められたHDL-C測定のレファレンス法は確立されていないが、米国ではCDC(Centers for Disease Control and Prevention)のHDL-C測定法が、米国NCEP(National Cholesterol Education Program)のHDL-Cの閾値設定の基本となっており、日常法の正確さ確認の基準として用いよう推奨されている(CDCレファレンス法)。また、デキストラン硫酸マグネシウム沈殿分離-Abell-Kendall比色法(Designated comparison method, 以下DCM法)は、CDCのCRMLN(Cholesterol Reference Method Laboratory Network)の指定比較法として位置づけられている<sup>3)</sup>。CDCレファレンス法とDCM法では、ともにAbell-Kendall改良法に基づいてコレステロールが定量されるので、高精度を得るには熟練した技術、労力や特別な器具試薬等を必要とする。

日本臨床化学会は、血中総コレステロールの測定にコレステロールデヒドロゲナーゼ(CDH)を用いる測定法<sup>4)</sup>を勧告法として確立しつつある。この方法は、Abell-Kendall法のような熟練した技術を必要としない上、正確な値が得られ<sup>4)</sup>、かつ自動分析機に適用できる。更に、デキストラン硫酸沈殿法は、米国で沈殿法の指定比較法として確立されており、CDCレファレンス法とよく一致することが示されている<sup>5)</sup>。

以上のような背景をもとに、日本臨床検査医学会標準委員会 脂質・リポ蛋白ワーキンググループではデキストラン硫酸沈殿法によるHDL分離と、コレステロールデヒドロゲナーゼによるコレステロール定量(CDH-UV法)とを組み合わせ、新しいHDL-C測定法(Dextran Sulfate magnesium-cholesterol dehydrogenase UV method, 以下DS-CDH-UV法)の比較法を検討したので報告する。この比較法は、臨床検査室において日常法の正確さの判定を可能にするものである。

#### II. 実験方法

##### A. 試料

試料は予備テスト、本テスト及び追加テストのそれぞれについて準備した。まず予備テストは国立循環器病センターで用意したHDL-Cとして20~80mg/dlの12検体を用い、本テストは自治医科大学大宮医療センター及び国立循環器病センターで採血し、血清分離後0.2 $\mu$ mフィルターで加圧ろ過した12検体を試料とした。追加テストは、検討会の6施設から集めた、HDL-Cとして30~70mg/dlの6検体を用いた。検体の中性脂肪濃度はすべて200mg/dl未満であった。

## B. 試薬

### 1. Abell-Kendall 法試薬

(i) 水酸化カリウムアルコール溶液…5.9mol/lの水酸化カリウム(試薬特級, 和光純薬工業製)水溶液6.0mlにエタノール(99.5 v/v%) (試薬特級, 和光純薬工業製)を加えて100mlとし, 用時調製した。コレステロールエステルの加水分解用として使用した。

(ii) n-ヘキサン(ヘキサン1000, 残留農薬試験用, 和光純薬工業製)…遊離コレステロールの抽出用として使用した。

(iii) Liebermann-Burchard 試薬…無水酢酸(生化学用, 和光純薬工業製)20容をあらかじめ氷水中で冷却し, その後, 硫酸(精密分析用, 和光純薬工業製)1容を混和しながら徐々に滴下し, 冷却後, 酢酸(精密分析用, 和光純薬工業製)10容を加えて, 用時調製した。コレステロールの発色用として使用した。

(iv) コレステロール一次標準液…米国のNIST(National Institute of Standards and Technology)のコレステロール標準品(SRM 911b, 純度 99.8%)をエタノール(99.5%)で溶解し, それぞれ25mg/dl, 50mg/dl, 100mg/dl, 200mg/dl, 300mg/dl, 及び400mg/dlから成る6濃度の標準液系列を調製した。保存期間を1年間とした。

### 2. CDCレファレンス法試薬

(i)  $d=1.006\text{g/cm}^3$ 塩化ナトリウム水溶液…恒量まで乾燥した塩化ナトリウム(試薬特級, 和光純薬工業製)の11.3958g/l水溶液を25°Cで調製し, 超遠心分画の密度液として使用した。

(ii) ヘパリン・ナトリウムは米国 Elkins-Sinn社製, 注射用5000単位/mlを使用した。

(iii) 塩化マンガン水溶液…塩化マンガン(II)四水和物(試薬特級, 和光純薬工業製)を脱イオン水に溶かし, 1.0mol/lとしたものを用いた。調製後の溶液はテフロンパッキンキャップ付き小試験管に分注し, 冷蔵庫での有効保存期間を1年間とした。

### 3. DCM沈殿試薬

デキストラン硫酸(Dextralip 50: Cat. No. 70-5800, Lot. No. 13001, Genzyme社製)2.0gを脱イオン水100mlに溶解し, アジ化ナトリウム(試薬特級, 和光純薬工業製)50mgを加えた液をデキストラン硫酸原液とし, 次に, 塩化マグネシウム六水和物(試薬特級, 和光純薬工業製)14.22gを脱イオン水100mlに

加えて溶解し, アジ化ナトリウム50mgを加えた液を塩化マグネシウム原液とした。各々, 原液を1:1に混合し, DCM試薬溶液とした。2~8°C保存で, 2年間有効とした。

### 4. アポEリッチHDLコレステロール測定試薬

沈殿試薬デキストラン硫酸・リントグステン酸-Mg<sup>2+</sup>(HDL・C・2「第一」分画試薬, 第一化学薬品製)を用いた。ポリエチレングリコール沈殿試薬は, ポリエチレングリコール6000(試薬特級, 和光純薬工業製)を脱イオン水に溶かし13%(w/v)溶液としたものを用いた。沈殿操作後のコレステロール濃度測定には, 両者とも共通の酵素試薬(HDL・C・2「第一」酵素液, 第一化学薬品製)を使用した。

### 5. CDH-UV法試薬

T-CHO試薬・K「コクサイ」(品番80010, 国際試薬製)を用いた。

## C. 実験操作法

### 1. Abell-Kendall法

Duncanらの方法<sup>9)</sup>に従った。

### 2. CDCレファレンス法

Hainlineらの方法<sup>7)</sup>に従った。

### 3. DCM法

検体1.0mlにDCM法用の沈殿試薬100 $\mu$ lを加え, ミキサーで5秒間混合し, 25°Cで15分間静置した。静置後, 1500 $\times$ G, 30分, 4°Cの遠心条件で冷却遠心し, 上清200 $\mu$ lを採取した。上清中のHDLコレステロールを, Abell-Kendall法で定量し, 得られた測定値に希釈倍数1.10を乗じて, HDLコレステロール値とした。

### 4. CDH-UV法及びDS-CDH-UV法

CDH-UV法はKayamoriらの方法<sup>9)</sup>によった。DS-CDH-UV法は, 3.のDCM法で得た上清5 $\mu$ lについて, CDH-UV法で測定した。国際試薬と国立循環器病センターの2ヶ所で測定し, 装置はそれぞれ日立7170自動分析装置(日立製作所製), TBA80FR自動分析装置(東芝製)を用いた。

### 5. 免疫学的方法による血清中総Lp(a)の定量

Lp(a)測定用試薬, (Lp(a)中外製薬社製)を用い, 自動分析装置H7170(日立製作所製)でLp(a)を定量した。

### 6. アポEリッチHDL-C濃度測定

千葉らの方法<sup>9)</sup>により, アポEリッチHDLを含むHDL-C測定法である13%ポリエチレングリコール沈殿法(PEG法)と, 含まないHDL-C測定法であ

るデキストラン硫酸リタグステン酸  $Mg^{2+}$  沈殿法 (DS-PT-Mg法) との測定値の差をアポEリッチ HDL-C 濃度とした。測定には、分光光度計 Beckmen DU640を用いた。

### III. 結果及び考察

#### A. HDL-C測定比較法の選択

##### 1. 比較測定法選択の考え方

Abell-Kendall法 (AK法) は前述のように熟練した技術の他に時間や労力を要するため、それを比較法に組み込んだ場合、十分な精度で実施できる施設は限られ、自動分析法に適用できない。本法のねらいは、できるだけ多くの施設で実施できるような比較法を確立するために、沈殿法と酵素比色法の組合せを選択した。

まず、沈殿法については、CDC レファレンス法であるヘパリン  $Mn^{2+}$  沈殿法を採用するか、デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿法を用いるかについて検討した。ヘパリン  $Mn^{2+}$  法は、 $Mn^{2+}$  が酵素的分析法に悪影響を及ぼすため除外した。デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿法は、米国において指定比較法に採用され、CDC レファレンス法とのデータの相関性が良いことから、HDL 分離沈殿法としてデキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿法を選択した。

酵素比色法の具備すべき条件は、(1) AK法と同等以上の正確さを有し、(2) HDL 分離に用いた試薬の

影響を受けないことである。

酵素比色法として、日本臨床化学会における予備検討データ<sup>4)</sup>をもとに、コレステロールデヒドロゲナーゼを選択した。次に、デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿法の試薬組成は、II. Cに示すように、高濃度のデキストラン硫酸及び、アジ化ナトリウムが含まれているが、この両者はコレステロールデヒドロゲナーゼに影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、HDL-C 測定の比較法の候補として、デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿分離後、コレステロールデヒドロゲナーゼ比色法による測定法を選択した。

##### 2. コレステロールデヒドロゲナーゼ法の原理及び正確さ

CDH-UV 法は、予備テストの12検体の総コレステロールを国立循環器病センターで測定し、CDC のAK法 (II. C. 1. 参照) と比較した。その結果を Fig. 1, 2に示した。両者のバイアスは、相対値0~2%で良く一致していた。

##### 3. デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$ 沈殿法における誤差要因

沈殿法による HDL-C 測定の誤差要因としては、リポタンパクの分離能と、Lp(a) 及びアポEリッチ HDL の存在が正確度に影響を与えるかどうか、デキストラン硫酸- $Mg^{2+}$  沈殿法について考察した。

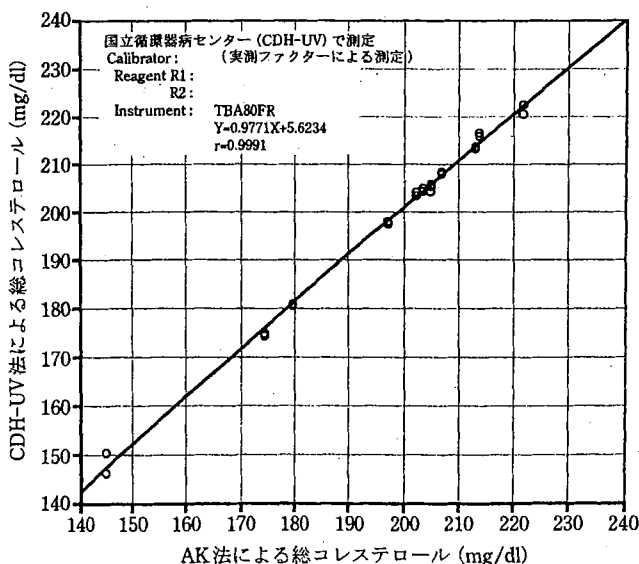


Figure 1 総コレステロール測定におけるAbell-Kendall法とCDH-UV法との相関性

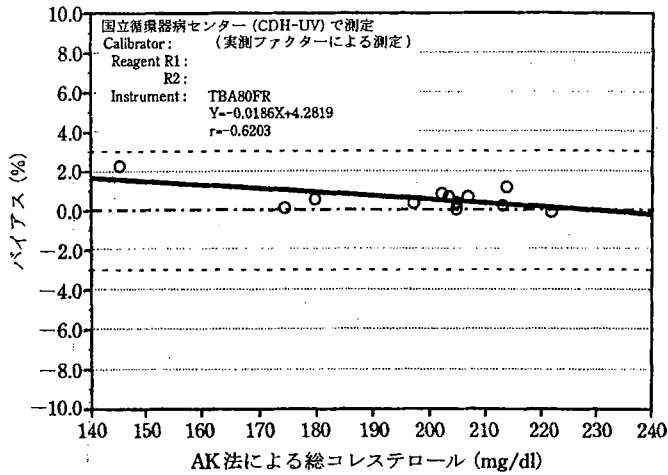


Figure 2 総コレステロール測定におけるCDH-UV法のAK法からのバイアス(相対値)

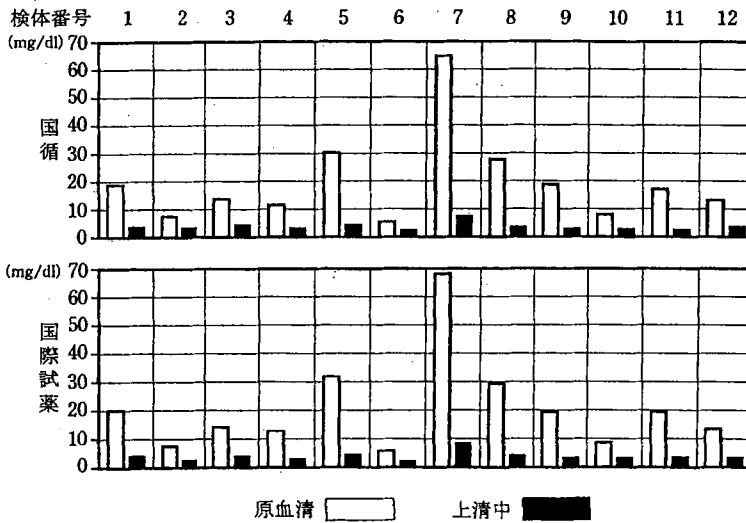


Figure 3 ラテックス凝集比濁法によるDCM法上清中Lp(a)の残存量

(i) リポタンパク間の分離能については、CDCレファレンス法との一致性率からみて、試薬組成はDCM法を同一のものを用いる。尚、この場合のリポタンパク分離に起因する誤差はない。

(ii) Lp(a)はアポBを含んでいるためデキストラン硫酸-Mg<sup>2+</sup>沈殿法では大部分が沈殿し、上清中には含まれない。免疫学的方法により12検体について、ラテックス凝集比濁法により、原血清と上清中のLp(a)量を比較した。Fig. 3に示すようにLp(a)の大半は沈殿しているが、一部残存が認められ、その部

分は誤差となる。

(iii) デキストラン硫酸-リンタグステン酸-Mg<sup>2+</sup>沈殿法ではアポEリッチHDLは沈殿し、HDL画分には含まれない<sup>9)</sup>ため、アポEリッチHDLのDCM法による分画物を免疫学的測定法、およびアポEプレート法の2方法で検討したが、アポEリッチHDLは沈殿しないことが示された。

(iv) TGが200mg/dl以上をこえる検体の場合、影響が認められるため、TGとして200mg/dl以下の検体の場合に限定した<sup>10)</sup>。TG高値検体については、

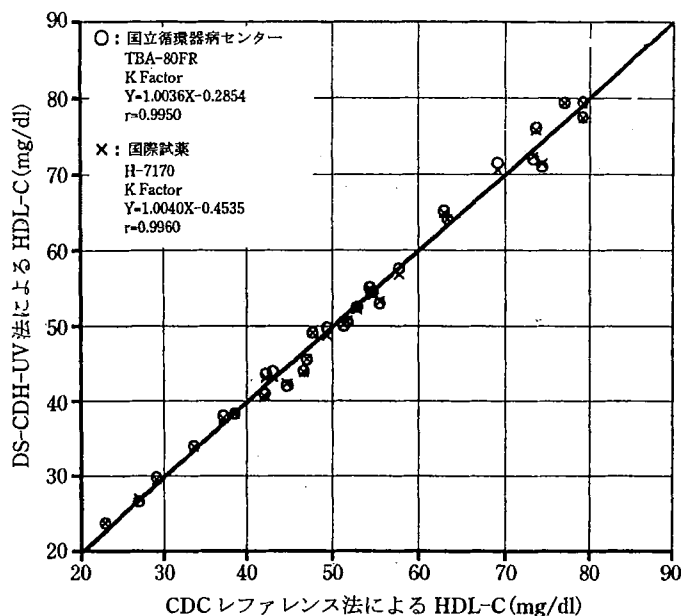


Figure 4 HDL-C測定におけるCDCレファレンス法とDS-CDH-UV法(K-ファクター法)との相関性

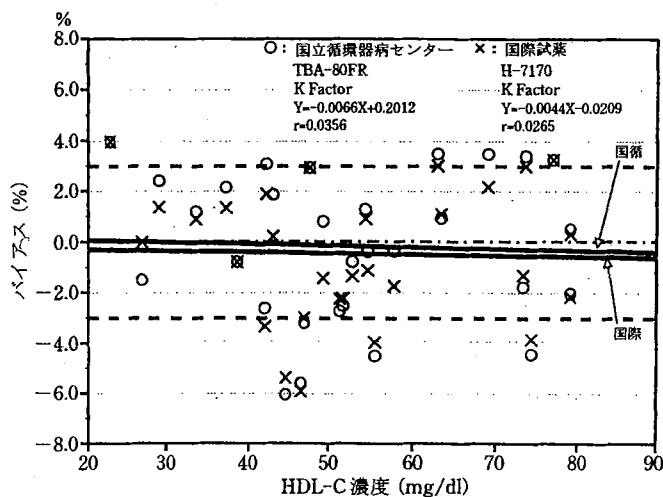


Figure 5 HDL-C測定におけるDS-CDH-UV法のCDCレファレンス法からのバイアス(相対値)

CDCレファレンス法によって測定する必要がある。  
 B. 比較測定法としてのDS-CHD-UV法とCDCレファレンス法との相関性

DS-CHD-UV法は、予備テストとして12検体で行い、本テストとして更に12検体を測定し、追加テストとして6検体の測定を行った。これらを総合した結果をFig. 4, 5に示す。図には国立循環器病

センター及び国際試薬の2施設の測定値をプロットしてある。図から、CDCレファレンス法に対するDS-CHD-UV法の相関は良く、濃度依存性はみられない。バイアスは相対値+4~-6%内で、NCEP(The National Cholesterol Education Program)が1998年達成目標としたCDCレファレンス法とのバイアス±5%<sup>11)</sup>からみて、満足すべき結果となっている。

Table 1 各種測定法によるHDL-コレステロール測定値比較

検体	血清中成分		HDL-コレステロール		HDL-コレステロール	
	Lp(a)	アポE HDL-C	CDC法	DMC法	DS-CDH-UV法 (KJ)	(KS)
No. 1	16.8	1.7	42.1	41.7	41.0	40.7
No. 2	6.7	1.6	47.0	46.8	45.5	45.6
No. 3	10.5	2.5	52.9	53.1	52.5	52.5
No. 4	10.3	2.3	51.8	51.5	50.5	50.7
No. 5	24.3	5.6	79.1	79.1	77.5	77.4
No. 6	6.6	5.4	79.1	80.3	79.5	79.4
No. 7	54.6	6.4	74.3	71.7	71.0	71.5
No. 8	25.2	1.5	44.7	44.2	42.0	42.3
No. 9	19.5	2.6	46.6	45.8	44.0	43.9
No.10	9.0	1.6	51.9	51.0	50.0	50.3
No.11	15.9	2.0	55.5	55.1	53.0	53.3
No.12	11.6	5.5	73.8	73.2	72.0	72.4

単位はmg/dl

KJ：国立循環器病センター

KS：国際試薬

C. 種々の測定法間の比較

本テストの12検体について測定法間の比較を行った。その結果をTable 1に示す。12検体の特徴としては、No.5, No.7及びNo.8のLp(a)が異常高値を、No.5, No.6及びNo.7でアポEリッチコレステロールが高値を示した。

Table 1から、CDCレファレンス法とDCM法との測定値は、概ね一致する。No.7においてコレステロール値として2.6mg/dlの差異がみられるが、これはLp(a)が高値によるものと思われる。

DCM法とDS-CDH-UV法との比較では(DS-CDH-UV法の結果は、大阪府立成人病センター集団検診第一部で行ったDCM法の上清を、異なる2施設国立循環器病センター及び国際試薬においてCDH-UV法によりコレステロール測定を行った。)、2施設間差は見られず、両者はよく一致している。

DS-CDH-UV法とCDCレファレンス法との比較については、III. Bでは予備テストも含めた結果を示したが、ここでは本テストとして慎重に行った結果について考察する。Table 1からNo.2, 4, 5, 7, 8, 9, 10において1.5~2mg/dlの差がみられた。これは、CRMLNの合格基準値(1mg/dl)<sup>12)</sup>からみてやや大きい。しかしこの合格基準はCDCレファレンス法での許容差であって、異なる測定法であるDS-CDH-UV法による測定値である点を考慮すれば満足すべきものである。

IV. 結 論

DC-CDH-UV法は、DCM法とよく一致し、自動分析装置に適用可能なため、多くの検査室において、日常検査法の正確さの評価に用いることができる。ただ、DCM法と同様、トリグリセリド高値検体については、その影響が無視できなくなるので、TG濃度200mg/dl以下の検体に限られる。

本ワーキンググループに勧告頂いた福祉・医療技術振興会(元理事長 河合 忠)でのHDL-C RMS技術検討会のメンバーに謝意を表する。

メンバー：櫻林郁之介、安部 彰、梅本雅夫、岡部紘明、片山善章、田中 明、中 甫、中村雅一、多々納俊雄、徳田邦明、物井恵一、渡津吉史、網野信行、菅野剛史

脂質・リポ蛋白ワーキンググループ委員名：

○櫻林郁之介(自治医科大学大宮医療センター)、片山善章(国立循環器病センター)、岡部紘明(熊本大学医学部)、安部彰(岐阜大学医療技術短大)、久保野勝男(エスアールエル研究員)

(○印 責任者)

## 文 献

- 1) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study. *Am J Med* 62 : 707~714, 1997
- 2) Huang YC, Kao JT, Tsai KS : Evaluation of two homogeneous methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 43 : 1048~1055, 1977
- 3) 中村雅一 : 生物試料分析 17 : 11~16, 1994
- 4) Kayamori Y, Hatsuyama H, Tujioka T, Nasu M, Katayama Y : Endpoint colorimetric method for assaying total cholesterol in serum with cholesterol dehydrogenase. *Clin Chem* 45 : 2158~2163, 1999
- 5) Warnick GR, Benderson J, Albers JJ : Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 28 : 1379~1388, 1982
- 6) Duncan IW, Mather A, Cooper GR : The procedure for the proposed cholesterol reference method, Atlanta, GA : Centers for Disease Control, 1988
- 7) Hainline A, Karon J, Lippel K, eds : Manual of laboratory operations, In : *Lipids Research Clinics Program*, Volume 1 Lipid and lipoprotein analysis (2<sup>nd</sup> ed), Bethesda, MD : U.S. Dept. Health and Human Services, 1982
- 8) Chiba H, Akizawa K, Fujisawa S, Osakanakamori T, Iwasaki N, Suzuki H, Itoh S, Matsuno K, Mitamura T, Kobayashi K : A rapid and simple quantification of human apolipoprotein E-rich high-density lipoproteins in serum. *Biochem Med Metabol Biol* 47 : 31~37, 1992
- 9) Hatch FT, Lees RS : Practical Methods for Plasma Lipoprotein Analysis. *Adv Lipid Res* 6 : 1~68, 1968
- 10) Myers GL, Cooper GR, Henderson LO, Hassemer DJ, Kimberly MM : Standardization of lipid and lipoprotein measurements. In Rifai N and Warnick GR, eds. *Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins*. Washington DC : AACC Press 1994. p177~205
- 11) Wiebe DA, Warnick GR : Measurement of high-density lipoprotein cholesterol concentration. in Rifai N and Warnick GR, eds. *Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins*. Washington DC : AACC Press 1994. p91~105
- 12) 第4回「HDL-C RMS 技術検討会」議事録