

血清コレステロールの測定と評価における課題

田中 喜代次¹⁾, 野又 康博²⁾, 武藤 京子³⁾, 新開 省二⁴⁾

抄 録

脂質異常症の診断・管理にはLDLコレステロール(low-density lipoprotein cholesterol), HDLコレステロール(high-density lipoprotein cholesterol), 中性脂肪(triglycerides)などの測定値が用いられる。これらの項目の血中濃度は、動脈硬化性の心臓・脳血管系疾患の防止を企図した日常生活スタイルの介入によって変化しうるからである。当然のことながら、これらの値が日常の臨床場面で適正に定量されなければならないことは言及するに及ばないが、LDL-Cを簡易に推定するのによく利用されるFriedewaldらの式は、中性脂肪の値が低い範囲にある時のみ高い信頼性を持つ。LDL-Cが高値と見なされた場合、たいていスタチンのような(稀にだが、さまざまな副作用をもたらす)薬の服薬が推奨される。しかも、基準となる実験室での定量分析結果と自動分析装置の結果に不一致が認められる。本稿において、リポ蛋白複合体の性質と特徴を明らかにするとともに、この複合体に含まれるコレステロール測定の原理、方法および測定値比較に関わる問題点について議論した。本総説は主に先行研究の発表内容に、そして一部は著者らのデータに依拠しているものである。

【キーワード】 コレステロール, LDLコレステロール, HDLコレステロール, 中性脂肪, Friedewald式

はじめに

コレステロール値と肥瘦度(BMI)や年齢との関係、減量や運動実践による影響などについては、本学会誌の前号¹⁾で解説した。その中で考えなければならなかったことは、脂質測定法に伴う不可避的な変動や誤差であった。特に測定値の比較調査においては、測定法とともに測定誤差は大きな問題点となる。脂質測定においては、測定前の採血時間帯、血液(血清)の保存方法、保存期間なども測定値に影響を与える(変動をもたらす)。Schistermanら²⁾の研究グループは、男性では精子の数が脂質値に影響を及ぼし、女性では月経周期に伴いHDLコレステロール値や中性脂肪値も変動すると述べている。後述するように、食事や運動などの介入前後でのHDLコレステロールやLDLコレステロールの5~10 mg/dl程度の変化を有効とみなすのは早計と考えられる。そこで、本稿においては、リポ蛋白の性質、

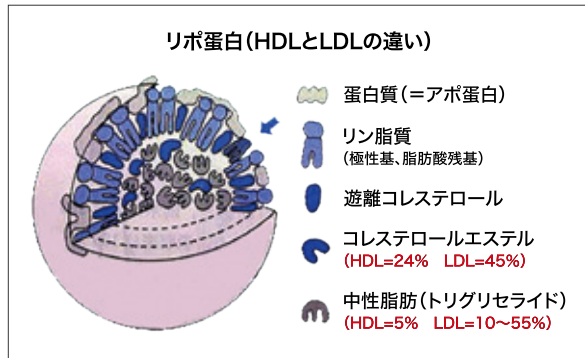
特徴を明らかにするとともに、脂質測定におけるグローバルな基準法および日常臨床での一般的測定法とその問題点、さらには測定値の統計学的な評価(コホートスタディ)や地域間、国際間、時系列での長期にわたる比較調査の問題点を明らかにする。

リポタンパク代謝と血清脂質検査

脂質とは生体から脂溶性溶剤によって抽出される非水溶性の有機化合物を総称するものである。血液中には、図1に示すように、蛋白質(アポ蛋白)のほか、リン脂質(phospholipid:PL)、遊離コレステロール(free cholesterol:FC)、コレステリルエステル(cholesteryl ester:CE) (HDL:24 %,LDL:45 %), 中性脂肪(triglycerides:TG) (HDL:5 %,LDL:10-55 %), そして遊離脂肪酸(free fatty acid:FFA)が存在する。FFAのみはアルブミンと結合して血中を流れているが、

1) 筑波大学 名誉教授, (株)THF 代表取締役
2) (株)THF 学術研究員
3) 水戸中央病院 内科部長, 健診センター百合が丘 医局
4) 女子栄養大学地域保健・老年学研究室 教授

図1 リポ蛋白の構造

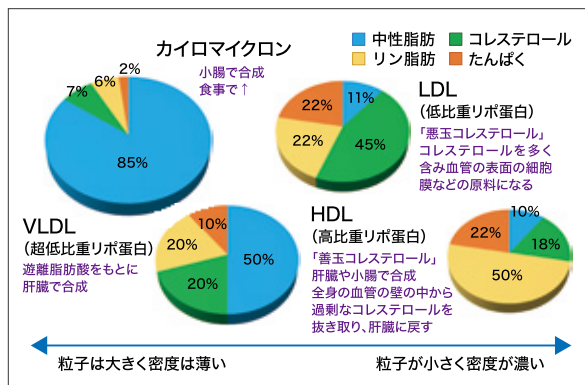


厚生省・日本医師会編：高脂血症診療の手引き，P16から引用
 日本医師会 <https://www.med.or.jp/>
 厚生労働省 <https://www.mhlw.go.jp/index.html>

それ以外の血清脂質は、疎水性のCEとTGを中心にアポリポ蛋白とPLを外層に配置した複合体(リポ蛋白)として循環する。この点について理解を深めるには、アポリポ蛋白(A1, A2, B, C2, C3, E)というトラックが各種脂質を運搬する構図を連想すると理解しやすい。ここで認識しなければならない重要な点は、アポリポ蛋白が脂質代謝の代謝経路を規定することである。脂質は水に溶けない性質を有しているにも関わらず、体内で代謝され血液中を移動できるのは、脂質がリポ蛋白複合体という特殊な型を作るからと考えられている。

図2に示す通り、リポ蛋白複合体は、組成や比重の違いからカイロミクロン(chylomicron:CM), 超低比重リポ蛋白(very-low-density lipoprotein:VLDL), 中間比重リポ蛋白(intermediate-density lipoprotein:IDL), 低比重リポ蛋白(LDL), 高比重リポ蛋白(high-density lipoprotein:HDL)に分類される。これらのリポ蛋白複合体の代謝は、食事由来の外因性経路と肝臓由来の内因性経路からなり、末梢の余剰コレステロールは肝臓へと逆転送される。日常の臨床検査においては、総コレステロール(total cholesterol:TC)

図2 リポ蛋白の種類と構造(野又康博, 2000)



やTG, FFAに加え、これらのリポ蛋白複合体中のコレステロールをLDLコレステロール(LDL-C)やHDLコレステロール(HDL-C)として定量されている。

コレステロール測定とその問題点

コレステロールはリポ蛋白複合体の形で体内を循環し、常に形態変化しているため、採血の時間帯、採血後の血清の保存方法や保存期間、さらに測定方法によっても値が変動する。また、LDL-CやHDL-Cには測定基準物質が存在しないため、測定方法間に系統的な誤差(平均値が異なるケース、差が比例的に拡大するケースなど)が生じることに留意しなければならない。例えば、コレステロールに限らず、ほとんどすべての検査値は24時間の中で、女性においては月経周期に応じて常に変動しているため、変動による数値の違い(誤差)を介入の効果と混同すべきでない。血清鉄は朝に高く、総蛋白は正午あたりから午後にかけて高く、赤血球数やヘモグロビンは午前が高く午後到低くなり、白血球数はその反対をとる。血糖や中性脂肪は食事や飲み物、さらには運動の影響を受けて増減する。HDL-CやLDL-Cは日差変動が10%程度、中性脂肪にいたっては15~25%程度に膨らむ。

グローバルな脂質測定基準分析は、米国のCDC (Centers for Disease Control and Prevention: 疾病対策予防センター)^{3,4)}が中心となり、その国際ネットワークであるCRMLN (US Cholesterol Reference Method Laboratory Network)が事業として展開している。CRMLNには世界7カ国の9施設が属しており、日本においては現在、国立循環器病研究センターがその責務を果たしている⁴⁾。以下に、脂質測定に関わる限界や課題について考察する。

総コレステロール(TC)の測定

総コレステロールの基準分析法(gold standard)はAbell-Kendall法(AK法)である。AK法とは、KOH(水酸化カリウム)性アルコールで、加熱加水分解したのち、コレステロール呈色反応(Liebermann-Burchard反応)でコレステロール濃度を算出するという原理に基づいている。この方法は高い精度を有するものの、必要とする検体量が多いこと、時間と労力がかかることから、検体の数が多い場合、迅速な測定には向かない。そこで、現在最も広く使用されている

るのが多数の検体を自動的に分析できる酵素法である。大きくは脱水素酵素法と酸化酵素法の二つに分けられる。分析手順の詳細は省くが、両法ともにNADH(還元型 nicotinamide adenine dinucleotide)を生成させ、生成されたNADH量を計測してTC濃度を算出する。酵素法ではわずか4 μ lの検体量(血液or血清)で約10分の間に反応が完結する。日本では、試薬会社7社が酵素法によるキットを発売している。このように、AK法と酵素法ではその測定原理が全く異なるため、酵素法での測定値がAK法の測定値と一致するかどうかの検定(標準化)は必須事項と言えよう。

HDL-Cの測定

リポ蛋白複合体は、粒子が小さくなるにつれて含有される蛋白質の比率が大きくなり、おのずと比重も大きくなる(図2)。その比重の違いを利用してリポ蛋白複合体を分離するのが超遠心法であり、この方法がリポ蛋白複合体の基準分析法とみなされている⁵⁾。分析手順の詳細は省くが、測定検体血清5 mlに対して比重1.006の塩化ナトリウム溶液を重層して約1日間超遠心を行い、LDLやHDLが含まれる下層の分画を集め、その分画にヘパリン・塩化マンガンを加えてHDL以外のリポ蛋白複合体を沈殿させ、残ったHDL分画のコレステロールをAK法で測定するものである。なお、AK法では必要となる検体量が多く、時間もかかり、リポ蛋白複合体の分画には高度な技術を要する。それゆえ、もう少し簡便な比較対照法(designated comparison method:DCM)がAK法とともに、日本では基準分析法の一つとして採用されている⁶⁾。

一方、臨床検査室では、抗体などを用いてHDL粒子以外のリポ蛋白複合体粒子を凝集させ、上清をTC測定で用いた酵素法でHDL-Cを測定する方法と、HDL粒子以外に含まれるコレステロールを分解した後に、残っているHDL中のコレステロールを酵素法で測定する方法が一般的である。HDL-C測定キットも日本企業7社くらいから出されているが、いずれもわずか2~4 μ lの検体量、10分の反応時間で測定が可能である。このように、HDL-Cにおいても基準分析法と自動分析装置における測定法は原理的に大きく異なっており、またTC測定と比較して複雑な工程が入っているため、測定値のバラツキも大きくなりがちで、自動分析法の標準化が希求されている。

LDL-Cの測定

LDL-Cの基準分析法はBQ法(beta-quantification method)⁷⁾である。ここでは、前述のHDL-C基準分析法である超遠心法を用いる。血清を比重1.006に調整し超遠心後、その下層を採取する。そこに含まれるコレステロールをAK法で測定し、上記のHDL-C値を引くことでLDL-C濃度とみなしている。HDL-C測定法と同様にLDL-C測定には必要な検体量が多く、時間もかかる。このため、日本企業6社から自動分析装置を用い、短時間かつ微量検体でLDL-Cを直接測定するキットが市販されている。これらの方法は日本企業が独自に開発した方法であり、わが国の臨床検査開発技術の高さを示すものであり、ホモジニアス法と呼ばれている。分析方法は基本的に以下の二つに大別される。

一つは、LDLを保護しておき、界面活性剤を用いてLDL以外のリポ蛋白複合体を分解し、コレステロール酵素法に反応しないようにブロックした後、LDL中のFC(free cholesterol)やCE(cholesterol ester)を酵素法で測定する方法である。もう一つは、界面活性剤や高分子リン化合物などを用いて、LDL以外のリポ蛋白複合体が可溶化しないように処理した後、LDLのみを可溶化させ、酵素法でコレステロール濃度を定量する方法である。実際には各社がそれぞれ異なる界面活性剤を用いており(各社の界面活性剤の詳細は未公表)、しかもIDLに対する作用や、脂質異常症症例でのVLDLなどに対する作用について不明な点が多い。試薬はそれぞれCDCの認証検査を受けてはいるものの、標準化の際に使用される検体はTG値が正常であることがほとんどであり、標準化という点では、TGが高値の場合など次項で述べる問題点⁸⁾をはらんでいる。

LDL-Cの定量(推定)をめぐる問題点

LDL-Cの定量(推定)に関しては、さまざまな問題点や課題のあることが指摘されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。一般的に、LDL-Cの推定にはFriedewald式($LDL-C = TC - HDL-C - TG/5$)を用いることが多い。これはTC値(mg/dL)からHDL-C値(mg/dL)を引き、さらにTG値(mg/dL)を5で割った値を引いて残ったものをLDL-C値とみなしている。この場合、VLDLに含まれるコレステロールは平均TG濃度の1/5(重量)であるという仮定に基づいているが、過去には1/6や1/8が検討さ

れたこともある。この1/5仮定はTG値が低い範囲にある時はかなり正確であり、推定結果は実測のLDL-C値をよく反映すると言われている。しかし、TG値が高くなるにつれてVLDLやカイロミクロンのコレステロール含有量は過小に見積もられることとなり、TG値の1/5なる計算値の妥当性が低下する。そのため、Friedewaldの簡易計算式を適用する場合、TG値が高くなればなるほど、LDL-C値は実際より低く算定されてしまう。この計算式が適用できるのはTG値が300~400 mg/dL未満とされているが、経験的にはこれより低くても注意が必要であると考えられる。TG値が400 mg/dlを超えると、LDL-C値はかなり不正確になってしまうので、使用すべきでないと考えられている。

一方、LDL-Cホモジニアス法(以下、LDLH法)が市場に出てきた当初は、TG値が800 mg/dlまでであれば問題がないといわれていた。しかし、2007年頃より、特に高TG血症におけるLDL-C値のばらつきが指摘され、2012年の動脈硬化性疾患予防ガイドラインでnonHDL-C値(nonHDL-C = TC - HDL-C = VLDL-C + IDL-C + LDL-C)が推奨されることになった。このことは、高TG血漿(血清)において、各キットで用いられる界面活性剤のリポ蛋白複合体に対する反応性が均一でないことに起因していると考えられる。脂質異常症のない症例やTG値が正常範囲内の症例ではLDLH法でも問題がないと認識されている。一般に脂質の異常高値あるいは異常低値の場合には不正確なLDL-C値が導かれるが、このLDLH法の問題点は、TG値が高い症例において管理基準に用いられるLDL-C値100~160 mg/dlの範囲で不正確となる点¹²⁾である。そのため、異なるLDLH法を用いた測定集団間での比較や国際間の比較が難しくなる。また、nonHDL-Cを基準とした大規模研究は現時点ではまだ少なく、より強いエビデンスの蓄積が期待される。

おわりに

これまで述べてきたように、LDL-CやHDL-Cなどの脂質測定における統計学的な評価(複数のコホートスタディの結果を統合したもの)や文献値に基づく地域間、国際間、時系列での比較には、特に注意しなければならない点が多く含まれることに留意すべきである。

引用文献

- 1) 田中喜代次, 野又康博, 笹井浩行ら: 血清コレステロールと肥瘦度, 年齢, 減量, 運動習慣化との関連. 日本健康運動看護学会誌 2020;1 (1):5-13.
- 2) Schisterman EF, Mumford SL, Chen Z, et al: Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. *Andrology*. 2014;2(3):408-415.
- 3) 中村雅一, 飯田稔, 折茂肇, 中村治雄: CDC/CRMLNによる血清総コレステロールの標準化. *動脈硬化* 1999;27(1・2):7-15.
- 4) 平山哲: 脂質異常症のスクリーニングと診断の進め方. *日内会誌* 2017;106:682~689.
- 5) Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al: Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem* 2010;56:977-986.
- 6) Miida T, Nishimura K, Okamura T, et al: Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014;233:253-259.
- 7) Miida T, Nishimura K, Okamura T, et al: A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2012;225:208-215.
- 8) 塚本和久: 脂質異常症の臨床検査 *日内会誌* 2013;102:3117~3124.
- 9) Nauck M, Warnick GR, Rifai N: Methods for measurement of LDL-cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem* 2002;48:236-254.
- 10) 齊藤政彦: LDL-コレステロール直接測定法における問題点. *産業衛生学雑誌* 2010;52:149-150.
- 11) Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al: Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density

- lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. JAMA 2013;310:2061-2068.
- 12) Yoshida H, Kurosawa H, Hirowatari Y, et al: Characteristic comparison of triglyceride-rich remnant lipoprotein measurement between a new homogenous assay (RemL-C) and a conventional immune separation method (RLP-C). Lipids Health Dis 2008;7:8-15.

Current Issues Regarding Measurement and Evaluation of Serum Cholesterol Levels

Kiyoji TANAKA, Yasuhiro NOMATA, Kyoko MUTOH, Shoji SHINKAI

Abstract

Serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) are generally used for diagnosis and management of dyslipidemia as these parameters can be modified, in part, by lifestyle improvements against arteriosclerotic cardio-and cerebrovascular disease. However, it is universally recognized that these measurements must be meticulously quantified in routine clinical settings as Friedewald et al.'s equation is reliable only when TG concentrations are within a relatively low range. Furthermore, discrepancies between standard and automated blood analyses are troubling, particularly for LDL-C, since guidelines for statins (which may carry severe side effect potential) rely on accurate measurements. In the current review, we use both an extensive literature review and our own novel data to clarify the most accurate assessment methodology for serum cholesterol levels within the lipoprotein complex. We also define the biochemical function and characteristics of the lipoprotein complex along with some guiding principles for laboratory measurement.