

解説 ここが知りたい!

LDL コレステロールとは？ その測定法の問題点と解決策は？

東京医科歯科大学 名誉教授・
(株)スカイライト・バイオテック技術顧問 **岡崎三代**

1 はじめに

2008年4月から全国一斉に特定健診（メタボ健診）が始まりました。目的は、“メタボリックシンドローム”と呼ばれる糖尿病，さらには心臓血管障害を引き起こしやすい病態を早期に発見し，生活習慣の改善を指導して健康を増進させ，疾病予防により医療費の削減につなげることです。

メタボリックシンドロームという病態は，肥満，高血圧，脂質異常，耐糖能異常の4項目から判定されます。脂質異常は血中の中性脂肪（TG）濃度とHDLコレステロール（HDL-C）濃度の検査値が使われ，絶食下のTG濃度が150 mg/dL以上かつ/またはHDL-C濃度が40 mg/dL以下の場合に脂質異常と判定されます。脂質の検査は，TG，HDL-CおよびLDLコレステロール（LDL-C）の3項目が必須となっています。なぜ，メタボの判定に必要なLDL-Cを検査するのでしょうか？ LDLとはどのようなもので，どのように測られるのでしょうか？最近，small, dense LDLはLDLの中でも超悪玉であるといわれています。LDLの中にもいろいろ種類があるのでしょうか？ LDLはすべてが悪玉なのでしょうか？

特定健診が開始される1年前，日本動脈硬化学会の「動脈硬化性疾患予防ガイドライン（2007年版）」が，リスク判定のために血清総コレステロール（TC）値でなく，LDL-Cを用いることに改定され，これを受けて，特定健診でLDL-Cが必須項目となりました。ところが，2010年4月26日に特定健診ではTCを測定することを強く希望するという学会声明が発表され，引き続き7月15日に第41回日本動脈硬化学会にてLDL-Cの直接法の問題点が指摘されました。

なぜこのような問題が提起されたのでしょうか？

2 LDL コレステロールとは

LDLとは低密度リポタンパク（Low Density Lipoprotein）の略でリポタンパクと呼ばれている粒子の1種類です。リポタンパクの構造はFig. 1に示すよう

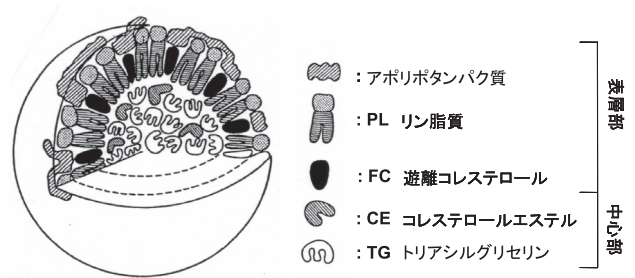


Fig. 1 リポタンパクの構造

に水に溶けない油であるコレステロールエステル（CE）とTG（中性脂肪，トリアシルグリセリン）をコアとし，両親媒性のリン脂質やアポリポタンパクによって覆われたいわばミセル様粒子です。血中には大きく分けて4種類のリポタンパク，カイロミクロン（CM），VLDL（Very Low Density Lipoprotein），LDL，HDL（High Density Lipoprotein）が存在します。コア成分のCEとTGは密度が1.0より小さく，表層成分のリン脂質，アポリポタンパク質，遊離コレステロールは密度が1.0より大きいため，サイズと密度の間には反比例の関係があります（Fig. 2）。図中大文字で示した各主要クラスは大きさや密度の違うサブクラスが集合したものです。

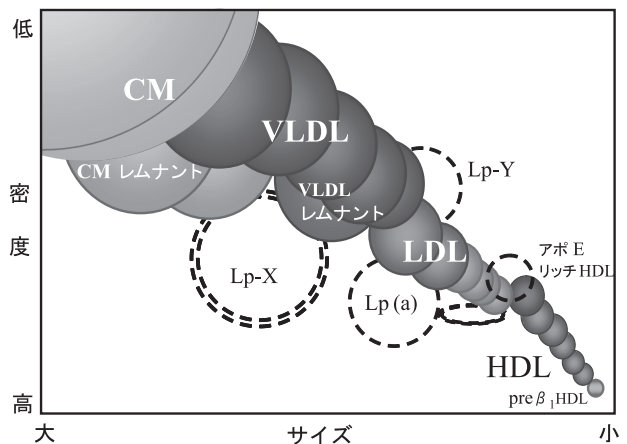


Fig. 2 リポタンパクの大きさと密度の関係

血中の TC 濃度が 240 mg/dL を超えると、動脈硬化発症率が急上昇することは国内外の疫学研究で確かめられています。TC 濃度は VLDL, LDL, HDL のコレステロール濃度の総和であり、正確に動脈硬化リスクを評価するためには、LDL-C を測ることが理想です。そこで、2007 年版のガイドラインで TC に替って LDL-C 測定が提案されました。

VLDL はその密度が 1.006 g/mL 以下、LDL は 1.006 から 1.063 g/mL、HDL は 1.063 から 1.21 g/mL の粒子として定義されています。その基準分析法は血清を密度 1.006 g/mL, 1.063 g/mL, 1.21 g/mL で 3 回超遠心を行い、各段階の上層のコレステロール濃度を測定し、回収率から原血清濃度に補正して VLDL-C, LDL-C, HDL-C 濃度を求めます。大量の血清、長時間の遠心、スライサーによる上層の分離と回収、下層の密度調整など高度な技術を必要とし、臨床検査法として、さらには標準化の基準分析法としても実用化は困難です。

そこで、1970 年代から超遠心に替る HDL-C の定量法として沈殿法が用いられるようになりました。沈殿法分離の原理はポリアニオンと金属イオンを血清に加えてプラス電荷をもつアポ B 含有リポタンパク (CM, VLDL, LDL) を沈殿させ、上清に分離される HDL に含まれるコレステロールを測定する方法です。ポリアニオンや金属イオンの種類や濃度の違う多くの沈殿分離試薬が検討されてきましたが、ヘパリン水溶液 (分子量 6 万, 5000 IU/mL) 80 μ L と 1M $MnCl_2$ 100 μ L を 2.0 mL の血清 (乳び血清では密度 1.006 g/mL の超遠心下層分画) に加えて混和後静置し、アポ B 含有リポタンパクを沈殿させる方法が CDC (Centers for Disease Control and Prevention) による標準化の基準法に採用されています。

3 その測定法の問題点とは

1995 年にわが国で沈殿分離をしなくて HDL-C を測定

できる直接法が開発されました。自動分析計で測定できるため、沈殿法に替わって繁用されるようになりました。HDL のみのコレステロールを反応させるための条件の違いに基づいてさまざまな原理の HDL 直接測定法が次々と開発されました。その結果、試薬の成分の違いに基づく測定値の差が問題にされ、測定法の標準化が重要となりました。HDL-C の基準分析法として選ばれたヘパリン / Mn^{2+} 沈殿法による目標値とのズレが $\pm 5\%$ 以内を合格基準として、CDC のネットワークの日本代表ラボである大阪府立健康科学センターの脂質基準分析室で認証試験が実施されております。

HDL-C の直接法に引き続き、分離操作を行わないで自動分析計で LDL-C を測れる直接法がわが国で開発されました。HDL-C の直接法を製造しているメーカーで測定原理の違う試薬が次々と開発され、現在では製造元、販売元の違う商品が多数使われており、こちらも測定法の標準化が重要となりました。CDC が LDL-C の国際基準法として選んだ β -Quantification (BQ 法) は超遠心による分離とヘパリン / Mn^{2+} 法による沈殿分離を組み合わせた方法です。BQ 法は、3 回の段階的超遠心分離と濃度補正の必要な基準法と比較して、血清のバックグラウンドの密度での 1 回の超遠心分離と下層の定量的回収により濃度補正が不要で時間と空間を超えて比較可能です。その操作手順を Fig. 3 に示します。血清の超遠心分離、沈殿分離操作、アベルケンダール法 (化学的コレステロール定量法) によるコレステロール濃度測定は全て二重に行われ、1 回の操作で LDL-C と HDL-C について各 4 つ測定値が得られます。血清 5.0 mL をホールピペットで超遠心用試験管に入れ、血清のバックグラウンドの密度と同じである生理食塩水を重層します。105,000 \times g で 18.5 時間遠心後、遠心管の中央部の透明層をスライサーでカットし、下層を生理食塩水で洗いいれながら 5.0 mL のメスフラスコで定容にするとボトムフラクションがえ

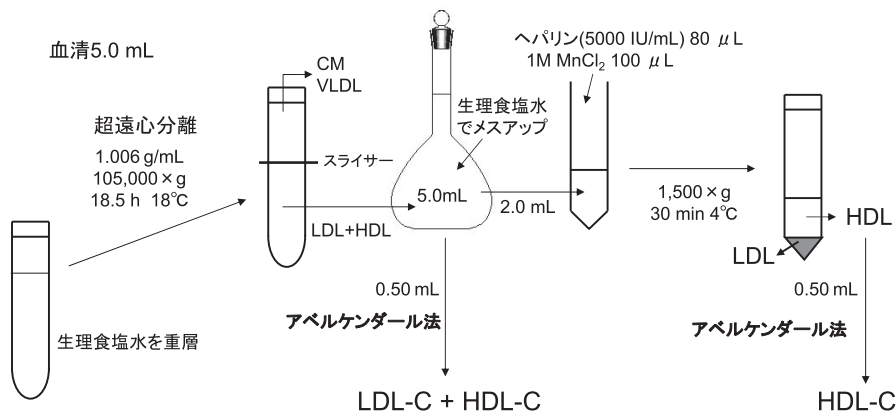


Fig. 3 CDC 基準法による LDL-C (BQ 法) と HDL-C の測定

られます。このうちの0.5 mLを用いてコレステロールを測定し、密度が1.006 g/mL以上のLDLとHDLのコレステロールの総和が求まります。ボトムフラクションのうち2.0 mLを用いて、ヘパリン(分子量5万、ロットを厳密に指定されたもの)とMnCl₂水溶液でアポB含有リポタンパク(LDL)を沈殿させ、その上清の0.5 mLを用いてコレステロールを測定し、HDL-Cを求めます。LDL-Cはボトムフラクションのコレステロール濃度と沈殿分離上清のコレステロール濃度(HDL-C)の差として求めます。

Fig. 2に示した血中に存在するコレステロールやTGを含むリポタンパク粒子の密度と大きさの関係のうち、破線で示したものはリポタンパクの粒子表面にアポaと呼ばれているタンパクが結合したLp(a)、二重膜の袋状や円盤状の構造を持ったLp-X、サイズがLDLでTGリッチなLp-Yなどは密度と大きさの比例関係から外れ、分析法による乖離の原因になります。さらにサイズが同じでもTGリッチ粒子は密度が小さくなり、反対にCEリッチ粒子は密度が大きくなるためリポタンパクの分析値の乖離は避けられません。CDCが採用しているBQ法によって測定されるLDL-Cの中にはLDL以外にLp(a)、VLDLレムナントやCMレムナントの一部、アポEリッチHDL、Lp-Xなどが含まれます。乖離の原因となる成分は、肝不全、腎不全、LCAT欠損症、CETP欠損症など特殊な場合以外は極微量なため、高Lp(a)症例を除けば、通常の検体ではLDL-CのBQ法による判定基準の±4%のバイアスはクリアーできるはずです。CDCでLDL-Cの認証試験を実行する際に、BQ法との乖離に繋がるこのような成分が無視できることをアガロース電気泳動によるバンド検出によって確認されています¹⁾。さまざまな原理の直接法で測定されるHDL-CやLDL-Cの成分は分離操作がない手法であるため、実際に確認することができず、キット間の乖離原因の直接の究明が困難です。とくにHDL-Cに関しては次に述べる

Friedewaldの計算式によるLDL-Cの計算値に影響するため、さらに厳密な管理が臨まれます。

4 Friedewaldの計算式とは

1972年にFriedewaldにより、LDL-CをTCからVLDL-CとHDL-Cを差し引いて計算で求める方法が提案されました。VLDL-Cは実測値でなく、血中のTG濃度の5分の1であると仮定して、次式で計算されます。

$$LDL-C = TC - HDL-C - TG \times 1/5 \text{ (VLDL-C)}$$

CEリッチであるVLDLレムナントが多いⅢ型ではVLDL-Cが低値に、CMが含まれる場合(食後採血やLPL欠損症など)はVLDL-Cが高値に計算され、後者の場合はTGが400 mg/dL以上の検体を除くことによって乖離を避けることが可能です。脂質検査として一般化されているTC、TG、HDL-Cの3項目の測定値から計算でLDL-Cが求められ、多くの臨床研究で使われてきました。この3項目の測定が標準化されている限り、時間と空間を超えて比較可能な値であると考えられます。Table 1にコントロール群、高TG群(TG≥400 mg/dL)、CETP欠損を含む高HDL群、Ⅲ型高脂血症群(アポE2/2)、高Lp(a)群について、著者らが開発したゲル濾過HPLC法と計算式によるLDL-CをBQ法によるLDL-Cと比較した結果を示します²⁾。計算式によるLDL-Cは高TG群とⅢ型高脂血症を除けば、高Lp(a)や高HDLも含めてBQ法と有意差が見られませんでした。

5 その測定法の解決策とは

このようにリポタンパクの分析は非常に難しい課題をたくさん含んでいるわけですから、特定健診の現場で測定されている直接法によるLDL-CやHDL-Cに関するキット間の差が問題にされるのは必然です。

なぜ、TC測定に関してはキット間の差が問題にならないのでしょうか？これはリポタンパク全体に含まれる

Table 1. LDL-Cの比較：BQ法、HPLC法、計算式(文献2)

		(平均±SD)				
		コントロール (n=50)	高TG (n=17)	Ⅲ型(E2/2) (n=8)	高HDL (n=10)	高Lp(a) (n=12)
LDL-C (mg/dL)	BQ	115±32	87±50	58±17	126±39	137±54
	HPLC	111±30	98±46	68±20	110±39	117±41
	計算式	115±30	N.D.	111±42	124±40	134±51
相関	BQ vs HPLC	r=0.984 [†]	r=0.980 [†]	r=0.765 §	r=0.970 [†]	r=0.992 [†]
	BQ vs 計算式	r=0.969 [†]	N.D.	r=0.808 §	r=0.995 [†]	r=0.996 [†]
%	(HPLC-BQ)/BQ	-3.2±4.9 [†]	24.6±26.2 [‡]	21.0±26.4	-15.2±11.4 [‡]	-13.4±5.4 [‡]
バイアス	(計算式-BQ)/BQ	0.9±7.7	N.D.	92.2±38.8 [‡]	-2.6±4.6	-1.5±4.8

† P<0.001, ‡ P<0.01, § P<0.05

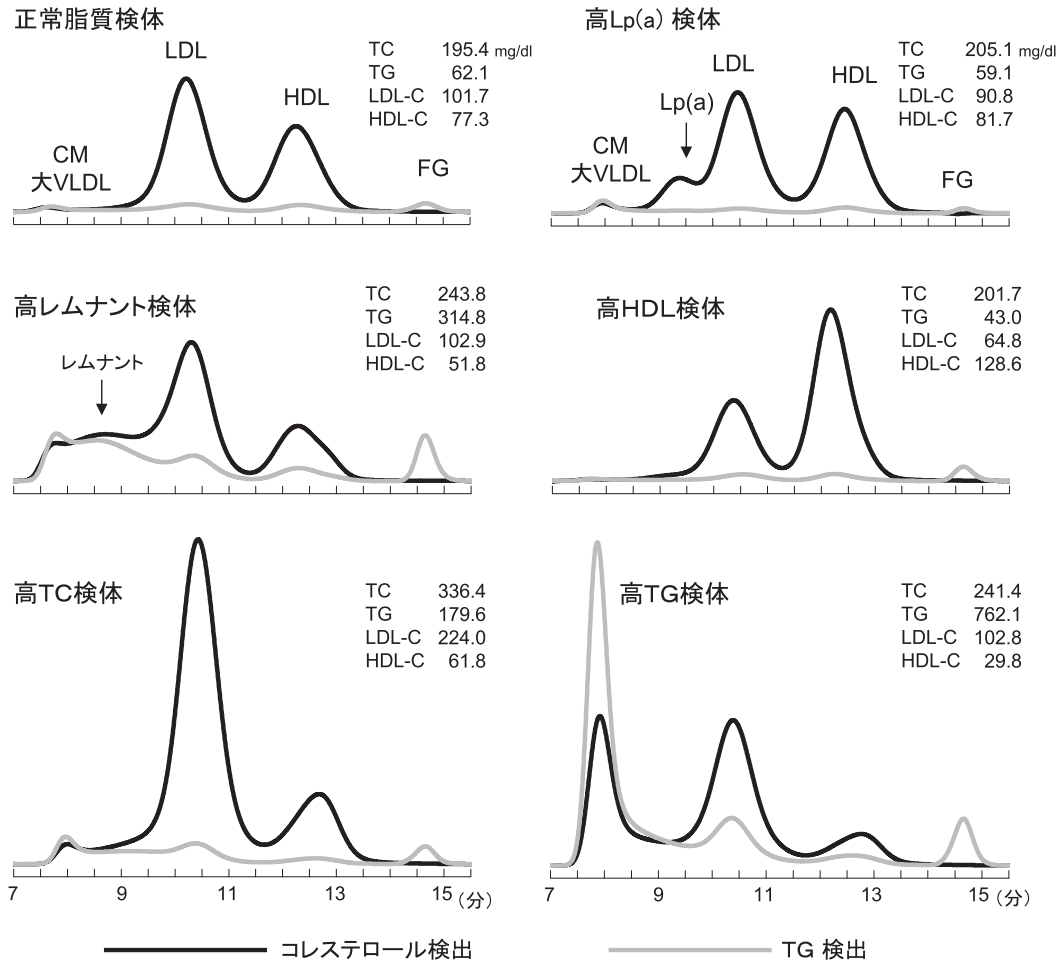


Fig. 4 迅速ゲル濾過 HPLC 法によるリポタンパクプロファイル (代表例)

Table 2. 迅速ゲル濾過 HPLC 法と CDC 基準法の比較

測定項目	方法	定量性 (CV 値)		CDC 基準法との相関 (n=88)
		同時再現性 (n=20)	日差再現性 (n=5)	
TC	コレステロール検出パターン全体の総面積	0.40%	0.99%	r=0.997
TG	TG 検出パターン全体の総面積 (FG 除く)	0.74%	1.28%	r=0.993
LDL-C	コレステロール検出パターンの LDL ピーク面積	0.44%	0.88%	r=0.983
HDL-C	コレステロール検出パターンの HDL ピーク面積	0.75%	0.62%	r=0.996
LDL サイズ	コレステロール検出パターンの LDL ピーク時間	0.045%	0.078%	-
HDL サイズ	コレステロール検出パターンの HDL ピーク時間	0.030%	0.056%	-

コレステロールを測っているからです。リポタンパク全体をコレステロールで定量的にプロファイルできる方法ならこの問題を解決できるはずです。

ゲル濾過は注入したサンプルがすべて回収でき、繰り返し使え、大きさのみの分離によるため、分析結果の解釈も容易で古くから研究手段では欠かせないリポタンパクの分析法の1つです。著者らは、ゲル濾過 HPLC を用いて、リポタンパク全体を定量的にプロファイルできる方法の開発を行ってきました。CM から HDL まで分

離できるゲル濾過カラムを用いて大きさと定義した20個のピークにガウス近似で分離し、4つの主要クラスとそのサブクラスのコレステロールとTG濃度、さらにピーク検出時間からLDLとHDLの平均粒子サイズを求める方法を確立しました。しかし、1検体あたり25分かかり、コストの面でも臨床現場での利用は限られています。ゲル濾過はサイズの分離範囲を選択することによって分析時間を短縮できる手法であり、VoidにCMと大型VLDLを排除し、LDLとHDL及びそのサブク

ラスの分析に焦点を当てた迅速ゲル濾過カラムを開発しております。1検体あたりの分析時間が9分で、カラムからの溶出液を2経路に分岐して得られるコレステロール検出とTG検出によるHPLCパターンから、血中のTC, TG, LDL-C, HDL-C, さらにLDLやHDLのサブクラスのコレステロール濃度やTG濃度が測定できます。またLDL-C測定の乖離の原因となるLp(a)はサイズがLDLとVLDLの間であるため、VoidとLDLピークの間でコレステロール検出で独立したピークとして観測され、レムナント、Lp-X, LpYは大きさやコレステロールとTGの組成からその存在を推定できるため、BQ法と直接法によるLDL-Cの乖離原因の究明に役立つ事が期待されます。

9分で分析可能な迅速ゲル濾過HPLCによるパターンの代表例をFig. 4に、CDC基準法との比較結果をTable 2にご紹介いたします。

油化学会の発展に多大な貢献をなされました故原一郎先生の夢の実現に向かって、30年にわたって拘り続けておりますゲル濾過HPLC法が迅速分析システムの確立により、広く臨床検査法として使われることを願っております。

参考文献

- 1) Nakamura, M. *et al.*, *J. Atheroscler Thromb.* **16**, 756-63 (2009).
- 2) Okazaki, M. *et al.*, *Clin. Chim. Acta.* **395**, 62-7 (2008).