

平成 29 年度

岡山大学大学院保健学研究科

博士学位申請論文

## 内容要旨

検査技術科学分野

臼井 真一 准教授 指導

7 3 4 2 5 4 0 1

池田 亮

平成 29 年 6 月提出

## 内 容 目 次

### 主 論 文

A rapid and precise method for measuring plasma apoE-rich HDL using polyethylene glycol and cation-exchange chromatography: a pilot study on the clinical significance of apoE-rich measurement.

(ポリエチレングリコールと陽イオン交換クロマトグラフィを用いた血漿中 apoE-rich HDL の迅速で精密な測定法の確立：apoE-rich HDL 測定の臨床的有用性に関するパイロット研究)

篠畑 綾子、村上 正明、日名 一誠、上川 滋、廣畑 聡、草地 省蔵、田村 有紗、  
臼井 真一

*Clinica Chimica Acta* 465 112-118 2017

### 副 論 文

無し

### 参 考 論 文

無し

## 主 論 文

ポリエチレングリコールと陽イオン交換クロマトグラフィを用いた血漿中 apoE-rich HDL の迅速で精密な測定法の確立：apoE-rich HDL 測定の臨床的有用性に関するパイロット研究

### [緒言]

高比重リポ蛋白質コレステロール (HDL-C) 値の低下は、冠動脈疾患の独立した危険因子であり、HDL は抗動脈硬化作用を有するリポ蛋白として知られている。また、HDL 粒子は異なるアポリポ蛋白 (apo) 組成を持つ不均一な集団で、個々の HDL 亜分画は固有の抗動脈硬化機能を有していると考えられている。apoE を含む HDL (apoE-rich HDL) は HDL 亜分画の一つで、先行研究から冠動脈疾患の有益な脂質指標に成り得る可能性が示唆されているが、簡便な分離測定法がないため、その研究は少ない。本研究では、apoE-rich HDL-C の測定と apoE-rich HDL の新しい分析法を確立し、測定性能と臨床的有用性の評価を行った。

### [方法]

#### 1. 沈殿法を用いた HDL の分離

13% ポリエチレングリコールを用いた千葉らの沈殿法 (PEG 法) で、apoB 含有リポ蛋白である低比重アポリポ蛋白 (LDL) 等を除去し、血清 (血漿) から HDL を含む上清を得た。

#### 2. 陽イオン交換クロマトグラフィ

apoE-rich HDL の分画には、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) システムと陽イオン交換カラム (HiTrap SP HP、1mL、GE Healthcare) を用いた。カラムを 40 mmol/l の  $Mg^{2+}$  を含む buffer A で平衡化した後、サンプルを注入し、HDL をカラムに吸着しない分画 (unbound HDL) と、1 mol/l 酢酸ナトリウムを含む buffer B で溶出する分画 (bound HDL) に分離した。カラムからの溶出液は、コレステロール検出用酵素試薬でオンライン検出した。

#### 3. HDL の分離精製

アルブミンなど他の蛋白を含まない HDL は、PEG 法と超遠心法を組み合わせで精製した。精製 HDL は陽イオン交換クロマトグラフィで bound HDL と unbound HDL に分画し、

各分画の粒子径とアポリポ蛋白の組成を確認した。

#### 4. LDL と HDL の平均粒子径の測定

リポ蛋白の平均粒子径は、ゲルろ過カラム (Superose 6HR) を用いた HPLC 法で分析した。

#### 5. ELISA

陽イオン交換カラムで分画した bound HDL と unbound HDL のアポリポ蛋白組成 (apoA-I、apoA-II、apoE) は、サンドイッチ ELISA で分析した。

#### 6. 精密性と直線性の検討

PEG-カラム法の日内再現性の検討は、HDL-C 値が高値と低値の 2 検体を用い 10 重測定で行った。また、希釈直線性の検討は、正脂血清を連続的に希釈して行った。

#### 7. 他法との比較

PEG-カラム法で定量した apoE-rich HDL-C 値は、千葉らが報告した沈殿法での測定値と、比較検討した。

#### 8. 研究対象

PEG-カラム法と沈殿法の比較検討は、31 名の健常者を対象に行った (平均年齢 21.4 才、うち男性 7 名)。apoE-rich HDL-C 測定の臨床的有用性の評価は、冠動脈 CT を受診した 36 名の患者を対象に行った (平均年齢 71.5 才、うち男性 15 名)。冠動脈狭窄の存在は、50% 以上の血管腔の狭窄で定義した。

#### 9. 統計方法

データ分析は、SPSS ver 17.0.を用いて行った。 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

### [結果]

#### 1. HDL 分画の分離における buffer A の $Mg^{2+}$ 濃度の影響

HDL の分離における buffer A の  $Mg^{2+}$ 濃度の影響について検討を行った。buffer A の

Mg<sup>2+</sup>濃度が 0 mmol/l の時、HDL は陽イオン交換カラムに吸着しないが、Mg<sup>2+</sup>濃度の増加に従い bound HDL も増加し、20-40 mmol/l でその量はプラトーに達した。HDL 中の apoE (HDL-apoE) は、0 mmol/l では約 70%が非結合分画に溶出したが、40 mmol/l では、およそ 90%が結合分画に溶出した。以上より、HDL の分離における buffer A の Mg<sup>2+</sup>濃度は 40 mmol/l が最適であると考えた。

## 2. 精製 HDL 亜分画のアポリポ蛋白組成と粒子径

SDS-PAGE (CBB 染色) では、unbound HDL は HDL の主なアポリポ蛋白成分である apoA-I を含有し apoE を含まなかったが (apoE-poor HDL)、bound HDL は apoA-I、apoE 共に含有している (apoE-rich HDL) ことが確認できた。また、apoE-rich HDL と apoE-poor HDL で、粒子径はそれぞれ 14.2 と 11.2 nm、apoE/apoA-I 比は、 $1.09 \pm 0.315$  と  $0.010 \pm 0.011$  であった。

## 3. 精密性と直線性

PEG-カラム法は良好な日内再現性を示し、HDL-C、apoE-poor HDL-C、apoE-rich HDL-C の変動係数は、それぞれ高 HDL-C 検体では 0.29、0.33、0.61%、低 HDL-C 検体では 0.53、0.45、3.52%であった。希釈直線性も良好であり、コレステロール値の測定上限は、それぞれ 200、180、15mg/dl であった。

## 4. PEG-カラム法と沈殿法の比較

PEG-カラム法と沈殿法の apoE-rich HDL-C 値は有意な相関を示した ( $r = 0.724$ ) が、PEG-カラム法の測定値の方が低値を示した ( $3.2 \pm 1.3$  vs  $5.7 \pm 2.8$  mg/dl)。また、HDL-apoE 値と apoE-rich HDL-C 値の相関は PEG-カラム法 ( $r = 0.894$ ) の方が沈殿法 ( $r = 0.525$ ) より強かった。

## 5. apoE-rich HDL-C と他の生化学検査値との関連

apoE-rich HDL-C 値は 50%以上の冠動脈狭窄の有無で分けた 2 群で有意差は無かった。冠動脈カルシウムスコア (CCS) も両 HDL 亜分画と相関しなかった。重回帰分析では、中性脂肪 (TG) とアディポネクチン値が、apoE-rich HDL-C の有意に独立した予測因子であった。また LDL 粒子径のみ、apoE-rich/apoE-poor HDL-C 比の独立した予測因子であった。

### [考察]

本研究では、PEG法と陽イオン交換クロマトグラフィを用いた apoE-rich HDL の分析法を確立し、apoE-rich HDL-C 値の臨床的有用性について評価した。検討を重ねた結果、HDL-apoE の約 90%が結合分画に溶出する分析条件を得た。PEG-カラム法で分画した bound HDL と unbound HDL に含まれる apoA-I、apoE の組成から、両 HDL 亜分画はそれぞれ apoE-rich HDL と apoE-poor HDL であることを確認した。apoE-rich HDL は apoE-poor HDL と比較して、apoE/apoA-I 比が高く、粒子径が大きかった。apoE/apoA-I 比や粒子径など両 HDL 亜分画の特徴は、HDL-apoE の大部分がより大きな HDL 粒子に分布していることを示しており、既報とも一致したため、PEG-カラム法の高い信頼性を示していた。また、千葉らの沈殿法との比較では、PEG-カラム法がより強く HDL-apoE と相関したため、PEG-カラム法は apoE-rich HDL をより純度高く分画している事を示す結果が得られた。さらに、測定性能では臨床での使用に十分耐えうる日内再現性と希釈直線性を示した。PEG-カラム法は、apoE-rich HDL-C 測定だけでなく apoE-rich HDL を分画できるため、動物や培養細胞を用いた基礎研究により apoE-rich HDL の機能を解明する上で有用となり得る。

臨床研究では、apoE-rich HDL-C 値は、冠動脈狭窄の有無で分けた 2 群間で有意差は無く、CCS とも相関しなかった。さらに、PEG-カラム法の apoE-rich HDL-C 値は、先行研究と同様に HDL-C 値と強く相関しており、HDL-C 値と独立した臨床指標に成り得るのかという疑問が生じた。しかし、apoE-rich HDL-C 値は他の様々な脂質指標と相関し、重回帰分析では、apoE-poor HDL-C 値と比較して特に TG 値と強い負の相関、アディポネクチン値と強い正の相関を示した。HDL-C 値はしばしば肥満で減少し、アディポネクチン値と正の相関を示すが、HDL 亜分画と TG やアディポネクチンの関連についての研究は少ない。我々の新しい知見により、apoE-poor HDL と比較して apoE-rich HDL における TG やアディポネクチンを分泌する働きを持つ脂肪細胞の代謝へのより強い関与が、明らかになる可能性は高い。また、TG、アディポネクチン、年齢と性別で調整を行った重回帰分析では、apoE-rich/apoE-poor HDL-C 比のみ LDL 粒子径と正の相関を示した。LDL 粒子径は動脈硬化と関連があり、LDL 粒子径が小さいほど動脈硬化を促進させる働きが強い。HDL 粒子の不均一性は、動脈硬化の危険因子である LDL 粒子径と、全 HDL よりも重要な関連性を示し得る。

### [結論]

本研究で確立した PEG-カラム法は、apoE-rich HDL-C 測定において信頼できる分析性能を示した。また、臨床研究では、HDL 粒子の不均一性と脂肪細胞における代謝の関連性が示唆される結果が得られた。今後、ヒト、動物や培養細胞を使用した基礎研究において、apoE-rich HDL の生物学的機能や代謝の解明に PEG-カラム法が役に立つことが期待される。