

[原著]

血清の長期保存における HDL-C および LDL-C 測定値の変動について

松嶋和美¹⁾ 杉内博幸¹⁾ 眞部正弘²⁾

Variation of the values of HDL-cholesterol and LDL-cholesterol
in human serum under a long-term storage.

Kazumi MATSUSHIMA¹⁾, Hiroyuki SUGIUCHI¹⁾, Masahiro MANABE²⁾

1) 熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

2) 熊本大学医学部附属病院 中央検査部

1) Department of Medical Technology, Kumamoto Health Science University

2) Department of Laboratory Medicine, Kumamoto University Hospital

low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) や high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) の測定法は、1995年に直接法が開発¹⁾されて以来、日常検査法として定着しているが、採血後の血清保存時間と直接法による測定結果との関係は報告されていない。そこで、採血後、分離した血清を室温(25℃)、冷蔵(4℃)で保存し、直接法による LDL-C や HDL-C の測定値がどのように変化するかを検討した。その結果、採血後、1日以上保存すると血清中の脂質代謝関連酵素 Lactin-cholesterol acyltransferase (LCAT) や cholesteryl ester transfer protein (CETP) の作用で、HDL では、遊離型コレステロール (FC) は減少、エステル型コレステロール (EC) の上昇、トリグリセライド (TG) の上昇がみられた。これらの変化は、冷蔵保存よりも室温保存の方が大きかった。血清を長時間保存すると HDL を構成する脂質成分が変化するため、原理の異なる HDL-C 直接法間では測定値の乖離が大きくなった。

キーワード：HDL-C, LDL-C, 保存安定性, 直接法, LCAT 阻害剤

I. 緒言

高 LDL-C 血症、低 HDL-C 血症、高 TG 血症などの脂質異常症は、冠動脈疾患の危険因子であり、動脈硬化の予防という立場からメタボリックシンドローム健診項目にも指定されており、脂質異常症の診断・治療には HDL-C や LDL-C の測定が必須である。HDL-C, LDL-C の測定は1995年に直接法が開発され、国内だけでなく、世界中に普及している¹⁻⁶⁾。

HDL-C や LDL-C を測定する前に留意すべき事項としては、患者の生理的変動(食事、運動、性別・

年齢別、日内変動、季節変動、体位など)の把握、検体のサンプリング、検体の取り扱い、測定の妥当性(標準物質やトレーサビリティなど)の確認などがある。特に、採血後の検体の保存安定性は検査データの正確性を左右する大きな要因となる。日常の検査では、ほとんどの場合、採血後1日以内の短時間に測定が完了するために方法間差が大きくなることがないが、採血後の血清の保持時間が長くなると、原理の異なる HDL-C 直接法間で測定値の乖離が認められる。その要因として、脂質代謝関連酵素である LCAT や CETP の作用で HDL や LDL の構成成分

が経時変化したことにより、HDL-CやLDL-C直接法試薬との反応に影響を及ぼしたものと推察される。そこで、今回の研究では、血清を長期間保存した場合にHDLやLDLの構成成分がどのように変動し、それが直接法の測定値にどのような影響を与えるかを検討したので報告する。

II. 材料及び方法

1. 測定対象

同意の得られた健常成人ボランティア9名(20~60歳, 男性4名, 女性5名)に十分なインフォームド・コンセントを行った後, 通常の静脈採血を行って検体を採取し使用した。

2. 方法

採血後のHDL中の構成成分の変動がLCATによるものかどうかを検討するために, 血清にLCAT阻害剤を添加しHDL構成成分を安定化させた試料を対照として作製し, LCAT阻害剤無添加の血清と比較した。

1) LCAT阻害剤の選択と至適量の検討

血清中HDLに作用するLCAT活性を阻害するために, 採血時に凝固促進剤入りの10ml真空採血管に終濃度0~2.0mmol/L(0.5mmol/L間隔)になるようにLCATのSH基を阻害するLCAT阻害剤を注入し, LCAT阻害剤の至適量を検討した。LCAT阻害剤は下記のSH基阻害剤*(HMCS, GMBS, EMCS, SIAB, LC-SPDP, NEM)を採血管に添加して採血, 20分放置後, 4℃, 1000g(3000rpm), 10分間遠心し, 直ちに血清分離しLCAT活性を測定して阻害効果に優れた阻害剤を選択した。尚, LCATの測定試薬は, アナソルブ®LCAT(積水メディカル)を用いた。

*SH基阻害剤

HMCS: N-(6-Maleimidocaproyloxy) sulfosuccinimide, sodium salt

M.W.439.39, 同仁化学株式会社

GMBS: N-(4-(Maleimidobutyryloxy) sulfosuccinimide, sodium salt

M.W.382.28, 同仁化学株式会社

EMCS: N-(6-Maleimidocaproyloxy)

sulfosuccinimide, sodium salt

M.W.410.33, 同仁化学株式会社

SIAB: N-Sulfosuccinimidyl[4-iodoacetyl] aminobenzoate)

M.W.504.20, 和光純薬工業

LC-SPDP: Succinimidyl 6-[3' (2-pyridyldithio) -propionamide] hexanoate

M.W.527.25, 和光純薬工業

NEM: N-ethylmaleimide

M.W.439.39, Sigma-Aldrich Japan

SH阻害剤を0.5~10mmol/Lとなるように生食で溶解し, SH阻害剤50 μ l+ボランティア血清200 μ lを混合し, LCAT活性を測定した。

2) 検体の保存安定性の検討

検体の保存による変化を見るために, LCAT阻害剤添加及び無添加(対照)の採血管に採血し20分間室温放置後, 遠心分離(4℃, 1000g(3000rpm), 10分間)した。その後, 血清を採血後1時間, 4時間, 8時間, 1日(24時間), 2日(48時間), 8日(192時間)保存用として各2本ずつ有栓試験管に分注し, それぞれを冷蔵(4℃)と室温(25℃)に保存した。また, 採血から血清分離まで30分以上が経過してしまうため, 採血直後用として, 遠心分離不要で2分間で血清分離可能な真空採血管「チューブ21®-S」(ニットウボウメディカル)を用いて採血し, 血清分離後, 直ちに測定した。

3) 測定試薬

HDL-C, LDL-Cの経時変化は表1に示した国内5社の試薬を用い, その他の脂質検査項目の総コレステロール(TC), TG, リン脂質(PL), FC, 遊離脂肪酸(NEFA)については協和メデックス社製の試薬を用い, 試薬添付のパラメーターに従って, 日立7170型自動分析装置を用いて測定した。

4) HDL-Cの比較対照法(リファレンス法)

米国のCDC(米国厚生省疾病管理・予防センター: Centers for Disease Control and Prevention)では, デキストラン硫酸(dextran sulfate, DS)・Mg²⁺沈殿法(DS沈殿法)の上清をAbell-Kendall(AK)法で測定する方法をHDL-C測定法の比較対照法(Designated Comparison Method, DCM

表1 HDL-CとLDL-C の直接法一覧

| | |
|------------------|---------------------------|
| HDL-C 直接法 | |
| AH: | デタミナー L HDL-C(協和メディックス) |
| BH: | コレステスト N HDL(積水メディカル) |
| CH: | HDL-EX(デンカ生研) |
| DH: | L-タイプワコー HDL-C M(和光純薬) |
| EH: | HDL-C 試薬-KL「コクサイ」(シスメックス) |
| LDL-C 直接法 | |
| AL: | デタミナー L LDL-C(協和メディックス) |
| BL: | コレステスト N LDL(積水メディカル) |
| CL: | LDL-EX(デンカ生研) |
| DL: | L-タイプワコー LDL-C M(和光純薬) |
| EL: | LDL-C 試薬-KL「コクサイ」(シスメックス) |

法) としている。本研究では、DS 沈殿法の上清のコレステロールを AK 法の代わりに cholesterol dehydrogenase (CDH) を用いた酵素法 (DS-CDH-UV 法)⁷⁾ で測定する DCM 変法を HDL-C 直接法の基準とした。

5) HDL 構成成分の経時変化の検討

上述の保存血清に DS 沈殿試薬を添加し、遠心後に得られた上清 (HDL 画分) の TC, TG, PL, FC, NEFA を測定した。

Ⅲ. 結 果

1. LCAT 阻害剤の検討

6 種類の LCAT 阻害剤の効果を検討した結果、HMCS, GMBS, EMCS, SIAB, LC-SPDP では 1 mmol/L の濃度で残存活性は負を示し、強い

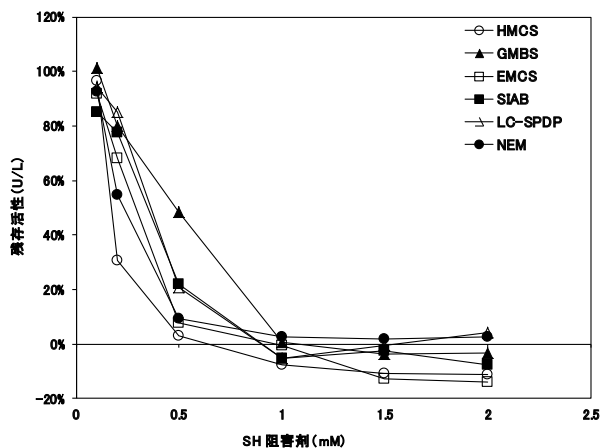


図 1. LCAT 阻害剤の阻害効果

LCAT 阻害効果が確認された。NEM も 1 mmol/L 以上で LCAT 残存活性がほとんど消失したが、他の 5 種の LCAT 阻害剤のように残存活性は負の値にはならなかった。また、他の LCAT 阻害剤と比較して安価であるため本研究では NEM を選択した (図 1)。

2. NEM による LCAT 阻害効果

次に、LCAT 阻害剤の効果を確認するため、採血時に終濃度が 2 mmol/L になるように NEM を添加して LCAT 活性を測定したところ、NEM 無添加で LCAT 活性は平均 450U/L であったものが、NEM 添加では平均 73U/L となり、約 85% の LCAT 活性が阻害された (図 2)。

3. HDL 構成成分の経時変化

冷蔵保存と室温保存の血清に DS 沈殿試薬を加えて遠心分離し、上清の HDL 画分中の TC, TG, PL, FC, NEFA を測定し、保存時間ごとの相対反応性 (保存時間の測定値 / 採血直後の測定値 × 100%) を算出した。LCAT 阻害剤無添加の冷蔵及び室温保存血清では、時間経過と共に TG の増加、FC の減少、FC/TC の低下が認められ、特に冷蔵保存よりも室温保存で顕著であった (図 3)。さらに、LCAT 阻害剤の添加及び無添加の室温保存の血清で HDL 画分中の TC と FC の経時変化をみるため、保存時間ごとの相対反応性 (保存時間の測定値 / 採血直後の測定値 × 100%) を算出した。図 4 に示すように、LCAT 阻害剤無添加の血清では、

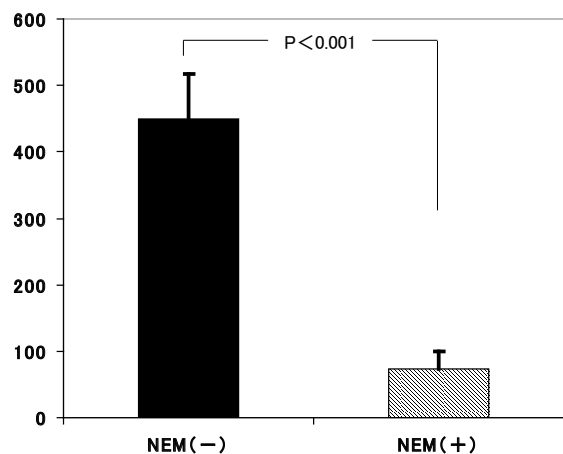


図 2. LCAT 阻害剤 (NEM : 2mmol/L) による LCAT 阻害効果 (平均値 +SD)

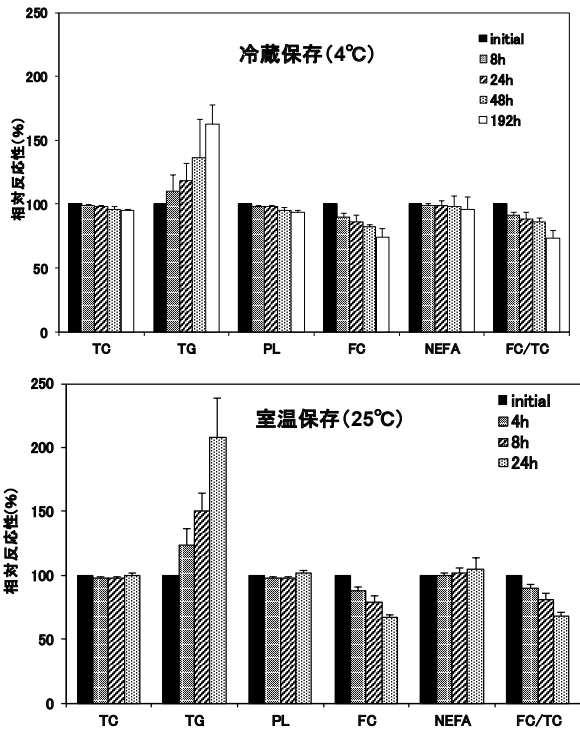


図3. 血清保存による HDL 構成成分の経時変化 (平均値 +SD)

採血後24時間放置でFCが約40%低下を示したが、LCAT 阻害剤添加の血清では、FCの低下は約10%に抑えられた。また、LCAT 阻害剤の添加及び無添加の血清において、HDL 内の TC (EC + FC) はほとんど変化しなかった。

4. 血清保存時間と HDL-C, LDL-C 測定値

血清の長期保存が HDL-C, LDL-C 直接法の測定

値にどのような影響を及ぼすかを検討した。NEM 添加及び無添加の保存血清を用いて、5社の直接法、DCM 変法で HDL-C, LDL-C を測定し、保存時間ごとの相対反応性 (NEM 無添加血清の測定値 / 添加血清の測定値 × 100%) を算出した。図5には NEM 添加及び無添加の冷蔵保存血清の結果を示す。HDL-C では、BH 法以外の直接法と DCM 変法では24時間保存で約3%の相対反応性の低下、192時間 (1週間) 保存では5~7%の相対反応性の低下が認められた。BH 法では、時間経過と共に上昇し、192時間で約5%上昇した。LDL-C では、その相対反応性の変動は試薬間で差が大きかったが、採血後24時間で約2~5%の上昇が認められ、その後192時間までは大きな変動は認められなかった。

IV 考 察

保存が長時間を経過した血清では、HDL-C, LDL-C 直接法間でデータの乖離が認められた。その原因としては、LCAT や CETP などの脂質代謝関連酵素の作用によるリポ蛋白を構成する脂質成分の変化が考えられる。LCAT は HDL を構成する FC を EC に変換し、CETP は HDL 中の EC を LDL や VLDL に転送し、さらに LDL や VLDL 中の TG を HDL 内に転送するという代謝のメカニズムが採血後の血液中でも機能している。HDL-C 直接法では、試薬メーカーによってその成分が異なっている特定の脂質構成のリポ蛋白を認識する界面活性剤やポリアニオンなどを用いているが、試薬開発

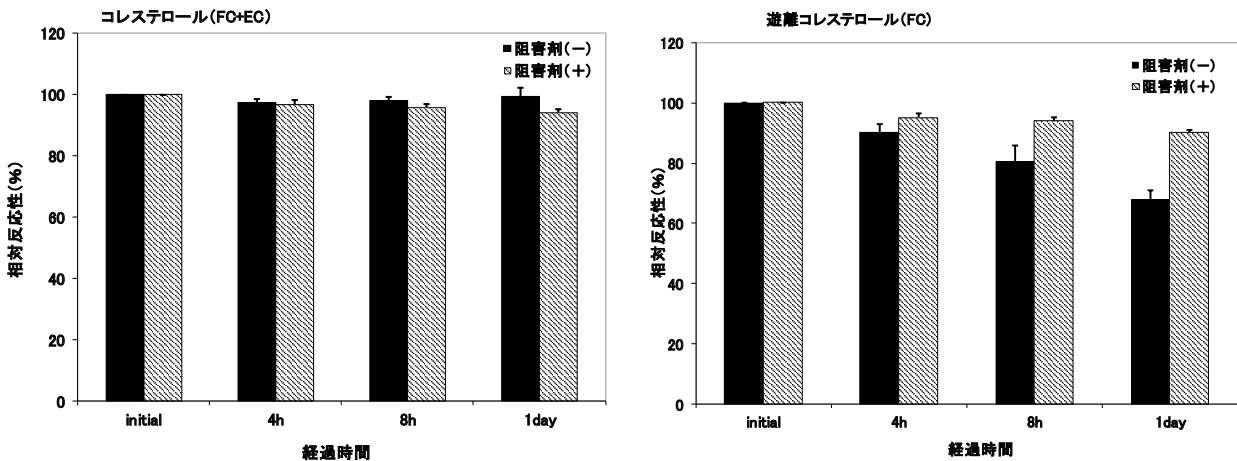


図4. 血清保存による HDL 画分中のコレステロールの経時変化 (平均値 +SD)

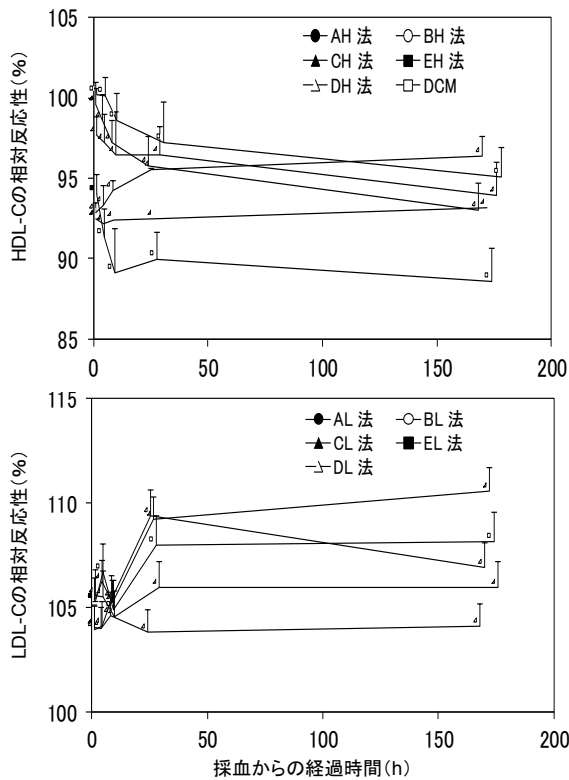


図5. 冷蔵保存血清における HDL-C と LDL-C 直接法測定値の経時変化

時には、新鮮血清を用いて CDC 基準法や超遠心法と一致するように処方設計しているが、長時間保存された血清の場合、血清中の HDL や LDL などのリポ蛋白構成成分が変化することにより、試薬の反応性が変わる。このため、血清の保存が長時間になるほど、リポ蛋白が経時変化するため直接法試薬に対する反応特異性が変わり、結果として測定値の上昇又は低下をきたして直接法の測定値に乖離を生じてしまうことが推測される。本研究では、長時間の血清保存によるリポ蛋白の構成成分の変化を防ぐ目的で、LCAT 阻害剤を用いたが、予め採血管に注入する必要があるため、日常検査への応用は難しいものと思われる。日常検査では、採血後、リポ蛋白の質的変性が少ない 8 時間以内、遅くとも 24 時間以内に測定を完了することが望ましいと思われる。

また、精度管理で用いられるサーベイ試料も採血後から数日経った血清のプール試料を用いる場合が多く、原理の異なる直接法の測定値に乖離が生じると考えられる。このため、採血時に LCAT 阻害剤を添加し HDL の構成成分を安定化した試料を作製することが望ましいと思われる。

V. 結 語

検体の保存を適切に行わないと、分析が正確に行われても検査データの臨床的価値は半減し、かえって誤った情報を与えてしまうため、正確な検査データを提供するためにも検体を適切に保存することが重要である。

文 献

- 1) Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, et al : Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cycrodextrin. Clin. Chem., 41:717-723, 1995.
- 2) Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, et al.: H. Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α -cycrodextrin sulfate. Clin Chem 44: 522-531, 1998.
- 3) Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, et al : Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α -cycrodextrin sulfate. Clin. Chem., 44:522-531,1998.
- 4) Warnick GR, Nauck M, and Rifai N: Evolution of Methods for Measurement of HDL-Cholesterol: From Ultracentrifugation to Homogeneous Assay. Clin. Chem. , 47:1579-1596,2001.
- 5) Nauck M, Warnick GR, and Rifai N: Method for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assay versus Calculation. Clin. Chem., 48:236-254,2002.
- 6) 杉内博幸, 松嶋和美, 安東由喜雄 : HDL コレステロール, LDL コレステロールの測定技術に関する最近の進歩. 臨床検査, 51 : 533-539, 2007.
- 7) 櫻林郁之介 : 新しい HDL-C 日常測定評価のための比較法. 臨床病理, 51 : 234-241. 2002.

(平成25年1月31日受理)

Variation of the values of HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in human serum under a long-term storage.

Kazumi MATSUSHIMA, Hiroyuki SUGIUCHI, Masahiro MANABE

The direct methods for determining LDL and HDL cholesterol developed more than a decade ago has been established as a routine laboratory procedure, but no published data are reported on the relationship between sample storage time and the accuracy of results obtained by the direct methods of HDL and LDL cholesterol. Therefore, using serum which stored for a long period of time at room temperature (25°C) or refrigerated (4°C), we examined the changes of the measured values of HDL-C and LDL-C. In case of HDL, the action of the lipid-related enzymes lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesteryl ester transfer protein (CETP) present in the serum lowered free cholesterol levels and increased esterified cholesterol and triglycerides in the serum stored for extended periods after sampling. The changes were more pronounced in the samples stored at room temperature than in the refrigerated samples. Changes in the lipid composition of HDL following the long-term storage of serum resulted in higher variability among the results obtained with HDL cholesterol direct methods based on different principles.