

HDL-C 試薬・KL「コクサイ」の基礎的検討

岸 浩司, 角山 功, 落合 浩二, 渡津 吉史

シスメックス株式会社試薬開発本部：神戸市西区室谷 1-1-2 (〒651-2241)

SUMMARY

従来のHDL-コレステロール濃度測定法は、遠心操作が伴うため自動化されていなかった。そこで、我々は本測定の効率化を図り、完全自動化に対応したHDL-コレステロール測定キット（HDL-C試薬・KL「コクサイ」）を開発した。

本法では、硫酸カリクス[8]アレン、非イオン界面活性剤（HLB = 18以上）及びクロモバクテリウム属由来のコレステロールエステラーゼ（CE）を用いてHDL-コレステロール濃度を測定する。すなわち、HDL中のコレステロールエステルはCEの作用でコレステロールと脂肪酸に加水分解される。このコレステロールはNADの存在下でコレステロール脱水素酵素（CDH）の作用で 4-コレステレン-3-オンに酸化される。このとき同時に生じるNADHを測定し、人血清由来のキャリブレーターで描いたキャリブレーションカーブからHDL-コレステロール濃度を求める。本試薬の性能を日立7170形自動分析装置を用いて、試料4 μ L、第一試薬180 μ L、第二試薬60 μ L、測定波長340/570nmとした2ポイントエンド法で確認した。コントロール血清（HDL-CコントロールM）を用いた日差再現性（n = 20）は、変動係数が1.2%（52.4 mg/dL）となった。高HDL-コレステロール試料（血清）を用いた定量性の確認試験で、150mg/dLまで原点を通る直線性が得られた。試料中に共存する還元性物質（ビリルビン、アスコルビン酸、ヘモグロビン等）は、測定結果に影響しなかった。健常人の血清（n = 53）を用いたCenters for Disease Control and Prevention（CDC）の比較対照法との相関性は、良好で回帰式： $y = 0.94x + 2.50$ mg/dL、相関係数： $r = 0.998$ となった。

今回開発したHDL-コレステロール測定キットは汎用の自動分析装置に適応できる有用性の高い試薬である。

Key Words HDL-コレステロール、ホモジニアス法、CDH-UV法

はじめに

HDL-C濃度の測定には超遠心法¹⁾、電気泳動法²⁾、HPLC法³⁾があるが、操作が煩雑なため、自動分析装置で多検体処理ができなかった。そこで、ポリエチレングリコール⁴⁾やポリアニオン-2価カチオン⁵⁾などの沈殿剤を用いてHDL画分を分離する方法が用いら

れてきた。これらの方法は完全な自動化ができず、他の臨床検査項目と同一ラインでの測定が困難で、検体の取り違えが生じ易いなどの問題を抱えていた。

我々は分離操作を必要としない自動化に適したHDL-C測定用試薬“HDL-C試薬・KL「コクサイ」”（HDL-C CDH-UV method）を開発した。

実験材料及び方法

1. 試料

Havelらの方法⁹⁾に従い、超遠心分離機((株)日立製作所製, himac CP70形)を用いて正常ヒト血清から超低比重リポ蛋白(VLDL), LDL及びHDL画分を分離して使用した。

2. 試薬

コレステロールエステラーゼの検討用酵素として、各種細菌由来の酵素を使用した。硫酸カリクス[8]アレン(C8A,スガイ化学(株)), NAD(オリエンタル酵母工業(株)), コレステロール脱水素酵素(CDH; 天野エンザイム(株)), その他の試薬はいずれも市販品のJIS特級あるいは試薬特級を用いた。

性能試験では、共存物質の影響を調べるために、合成抱合型ビリルビン(ポルフィリンプロダクツ社), 遊離型ビリルビン(シグマ社), ヒト血球を溶血させたヘモグロビン, ヒト赤血球由来の精製した乳酸脱水素酵素(シグマ社)を用いた。

3. コレステロールエステラーゼの選択

1.0U/mL各種コレステロールエステラーゼ(CE)及び200mmol/Lヒドラジンを含む100mmol/Lピペラジン-1, 4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝液(pH7.0)のCE溶液を調製した。超遠心操作で得たHDL, LDL及びVLDL画分50 μ LとCE溶液50 μ Lを混合し, 37℃で5分間反応させた後, 4%フツ化ナトリウム溶液100 μ Lを加えCEの反応を停止した。この混合溶液中の遊離型コレステロール濃度を測定して, 各種CEの加水分解量を測定した。遊離型コレステロール濃度の測定は, 市販キットを用いた。

4. HDL-Cの測定

*Chromobacterium viscosum*由来のCE⁹⁾(Chromo-CE)をHDL画分中のコレステロールに反応させCDH-UV法^{7, 8)}で測定した。すなわち, 2.0mmol/L C8A, 100mmol/Lヒドラジン, 0.5U/mL *Nocardia* sp. 由来のコレステロールオキシダーゼ(COD; ロッシュダイアグノスティックス社), 5.5mmol/L NADを含む10 mmol/L PIPES緩衝液(pH7.0)を第一試薬とし,

6.0 U/mL Chromo-CE, 24 U/mL CDH, 0.1% コール酸を含む500 mmol/L *N*-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸緩衝液(pH8.6)を第二試薬とした。なお, 血中乳酸脱水素酵素の影響を回避するために, 10mmol/L オキサミン酸を阻害剤^{9, 10)}として第一試薬に添加した。各種実験は, 日立7170形自動分析機を用いて, 2ポイントエンド法により, 試料量4 μ L, 第一試薬180 μ L, 第二試薬60 μ L, 及び測定波長を340/570nmで実施した。

6. 測定用標準液

HDL-C測定の標準液は, 脂質キャリブレーター(KL)(国際試薬(株))を使用した。標準値は, デキストラン硫酸ナトリウムと塩化マグネシウムを用いた沈殿法^{11, 12)}で値付けした正常ヒト血清から値を転換した。

7. 対照法

種々の対照法の内, Designed Comparison Method(DC法)³⁾は, 大阪府立健康科学センターで実施した。また, Thomasらの方法¹⁴⁾に従い超遠心法を実施した。

結果

1. コレステロールエステラーゼの選択

3種類のCEを各リポ蛋白画分に作用させ, 各リポ蛋白画分の総コレステロール濃度の残存率を表1に示した。Chromo-CEは, LDLよりもHDL及びVLDLに強く反応した。しかし, *Pseudomonas* sp. 由来¹⁵⁾と*Candida cylindracea*由来¹⁶⁾のCEはLDL, HDL及びVLDLに対する作用性に差が認められなかった。各リポ蛋白中のコレステロールを選択的に測定するために, HDLに高い特異性のあるChromo-CEを用いて以後の実験を行った。

2. VLDL, LDLの反応抑制

Chromo-CEはHDLに高い特異性があるものの, VLDL, LDLにも反応するため, 界面活性剤添加によりさらに特異性の向上をはかった。HDL-C測定試薬の第一試薬中に親水親油平衡(HLB)が18の非イオン性界面活性剤を0.3%添加したときにVLDLと

LDLへの反応性が抑制され、HDL-Cに対する反応特異性が高まった(図1)。

さらに、ホモジニアス法としての特異性を向上させるためにHDL-C測定試薬にCODの添加を試みた。第一試薬中にCODを0.5U/mL添加すると、VLDLとLDLの影響はほぼ完全に回避された。その上、CODを添加してもHDLに対する反応性には変化がなかった。その結果、HDL-Cに対する反応特異性が著しく向上した(図2)。

3. HDL-C 試薬・KL「コクサイ」の基本的性能

1) 再現性

ヒト血清1(34.7mg/dL)、ヒト血清2(56.7mg/dL)、ヒト血清3(94.5mg/dL)を用いた同時再現性の変動係数(CV%, n=20)はそれぞれ1.04%、0.69%、0.83%であった(表2)。

また、HDL-CコントロールM(国際試薬(株))を用い、3重測定したときの日差再現性の変動係数(CV%, n = 20, mean = 52.4 mg/dL)は1.2%であった。

2) 定量性

HDL画分をプール血清に添加して高濃度HDL-C検体を調製した。本検体を生理的食塩水で希釈した試料を用いて直線性を確認すると、150mg/dLまで良好な直線性が得られた(図3)。

3) 干渉物質の影響

干渉物質の影響を表3に示した。検体中に添加した還元性物質(ヘモグロビン、ビリルビン、アスコルビン酸、グルタチオン等)、乳酸脱水素酵素などの測定値への影響は認められなかった。

4) 対照法との相関性

対照法との相関性を図4に示した。DC法との相関性は、相関係数 $r = 0.998$ ($p < 0.0001$)、回帰式 $y = 0.94x + 2.50$ mg/dL ($n = 53$)となった(図4A)。高TG検体(400 ~ 1670mg/dL)を含む33例を用いて超遠心法の測定値と比較したところ、相関係数 $r = 0.993$ ($p < 0.0001$)、回帰式 $y = 0.98x + 1.40$ mg/dLであった(図4B)。本法はDC法、超遠心法の両者に良好な相関性を示した。

表1. 各種コレステロールエステラーゼのリポ蛋白分解能

各超遠心画分と各種コレステロールエステラーゼをPIPES緩衝液中で、37℃5分間反応させた。反応前後の総コレステロール量と遊離コレステロール量を測定し、次式から残存率(%)を求めた。

	各種コレステロールエステラーゼによる残存率(%)		
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Candida cylindracea</i>
HDL画分	14	6	84
LDL画分	76	6	94
VLDL画分	21	4	90

$$\text{残存率}(\%) = \frac{\text{コレステロールエステル} - \text{遊離コレステロール}}{\text{コレステロールエステル}^*} \times 100$$

*コレステロールエステル = 総コレステロール - 遊離コレステロール

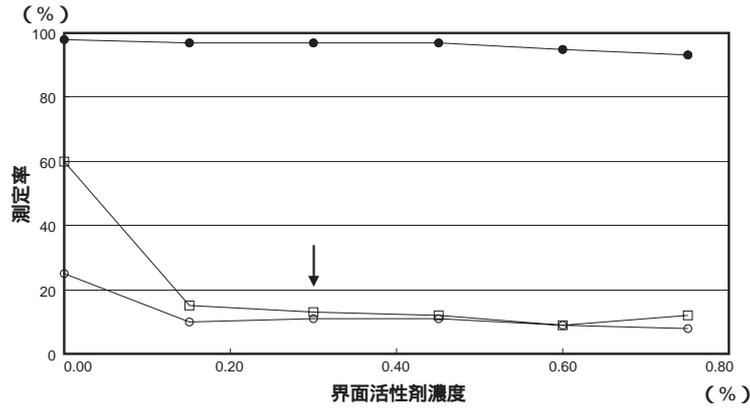


図1. 界面活性剤の各りが蛋白画分測定結果への影響

各超遠心画分 (● : HDL, □ : LDL, ○ : VLDL) の総コレステロール (HDL77 mg/dL, LDL 121 mg/dL, VLDL145 mg/dL) に対する各画分のHDL測定値の割合を測定率 (%) として示した。矢印は決定界面活性剤濃度を示す。

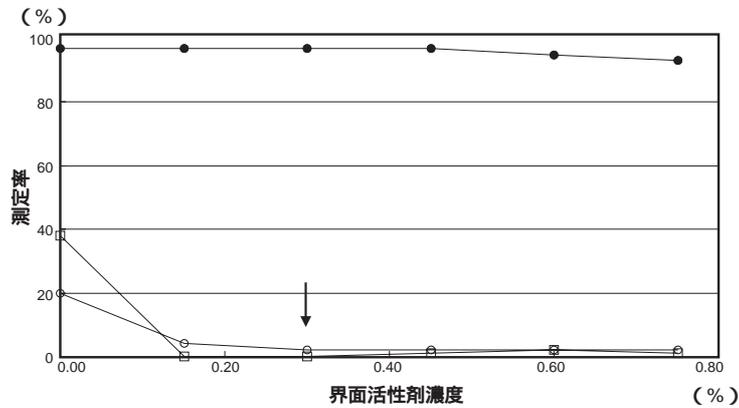


図2. 界面活性剤とコレステロールオキシダーゼが各りが蛋白画分のHDL測定値に及ぼす影響

第一試薬中に0.5U/mLコレステロールオキシダーゼと種々の濃度の界面活性剤を添加し、各超遠心画分 (● : HDL, □ : LDL, ○ : VLDL) 中のHDLを測定した。各画分の総コレステロール (HDL 77mg/dL, LDL 121mg/dL, VLDL 145mg/dL) に対するHDL測定値を測定率 (%) として示した。矢印は決定界面活性剤濃度を示す。

表2. 同時再現性

試料	標準液 (61mg/dL)	試料1	試料2	試料3
Mean. (mg/dL)	62.6	34.7	56.7	94.5
SD (mg/dL)	0.61	0.36	0.39	0.79
C.V. (%)	0.97	1.04	0.69	0.83
Range (mg/dL)	3	1	1	3

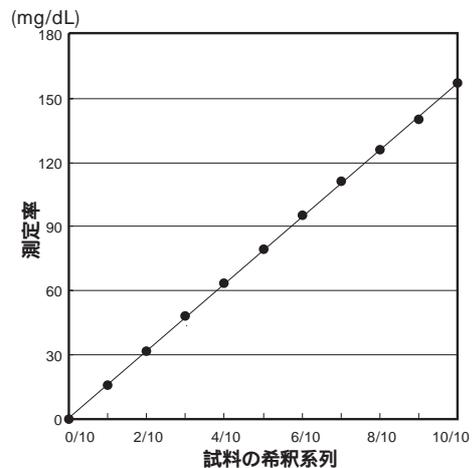


図3. 直線性

プール血清に超遠心HDL画分を添加して生理的食塩水で段階希釈した試料のHDLコレステロールを測定した。

表3 . 干渉物質の影響

試料に添加した化合物 (濃度)	測定値 (mg/dL)		干渉 (%)
	無添加	添加	
ヘモグロビン (500mg/dL)	55	55	0.0
ビリルビン (19.3mg/dL)	55	55	0.0
ジタウロビリルビン (21.0mg/dL)	54	54	0.0
アスコルビン酸 (100mg/dL)	60	60	0.0
グルコース (2g/dL)	59	59	0.0
マンノース (1g/dL)	60	60	0.0
フッ化ナトリウム (500mg/dL)	35	35	0.0
EDTA (200mg/dL)	60	60	0.0
シュウ酸 (400mg/dL)	54	54	0.0
グルタチオン・還元型 (50mg/dL)	59	59	0.0
ヘパリン (200mg/dL)	54	54	0.0
クエン酸 (1000mg/dL)	59	59	0.0
LD* (10000IU/L)+ビリルビン酸 (2mmoL/L)	60	60	0.0
LD* (10000IU/L) +乳酸 (2mmoL/L)	60	60	0.0

* LD: 乳酸脱水素酵素

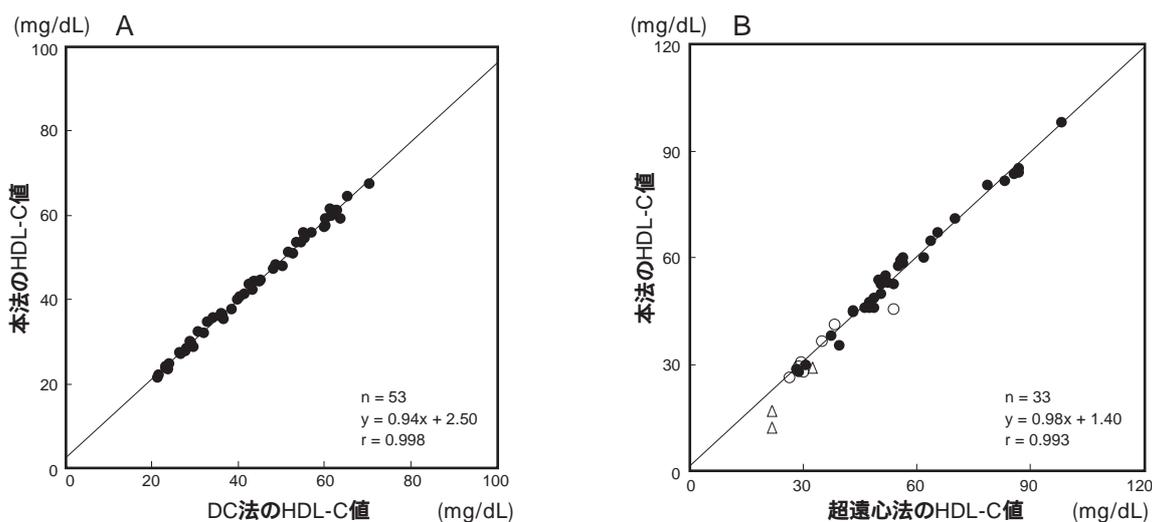


図4 . 対照法との相関性

A) DC法との相関性

B) 超遠心法との相関性

(: 0 < TG < 400mg/dL , : 400 < TG < 1000mg/dL , : TG > 1000mg/dL)

考 察

高脂血症は動脈硬化のリスクファクターの一つであり、その診断指標としてHDL-C測定値が広範に用いられている。治療指標のガイドラインが日本動脈硬化学会、高脂血症診療ガイドライン検討委員会によって作製され、HDL-Cは虚血性心疾患と負の相関性を示すリスクファクターとして有用性が示され

た^{17,18)}。

我々はChromo-CE, C8A及び*Nocardia* sp. 由来のCDHを用いて分離操作を必要としないHDL-C測定の本ホモジニアス法^{19,20)}を開発した。

HDL-C測定に採用したChromo-CEは、HDLに対して高い特異性があるものの、VLDL及びLDLにも若干反応する欠点があった。HLBが18の非イオン界

面活性剤を反応系に加えることで、VLDL画分への反応性を抑制することができた。この現象で、CEの作用性とリポ蛋白質表面電荷や表面構造の変化と密接な関係があると推察された。しかしながら、HLBが18の非イオン界面活性剤を添加するだけでは本法のVLDLとLDLに対する反応を完全に阻害することが出来なかった。そこで、VLDLとLDL表面の遊離コレステロールを予めCODで酸化させておくと、その後のCDHの作用を受けなくなる²¹⁻²³⁾と考えてCODを添加する方法を検討した。その結果、期待どおりにVLDLとLDLの正の影響を更に回避することができた。また、CODを添加してもHDLに対するCDH反応は全く変動しなかった。

HDL-Cのホモジニアス法は再現性、直線性に優れ、干渉物質の影響をほとんど受けなかった。特に、本法の測定原理がNADHを測定指示物質とするCDH-UV法を用いるため還元性物質の影響を受けないことが大きな特徴となっている。DC法や高TG検体を含む超遠心法との比較においても大きく乖離する現象は見られず良好な相関性が得られた。

本法はHDLに特異性の高いChromo-CEをCDH-UV法と組み合わせて、分離操作や特殊な装置を必要としないホモジニアスHDL-C測定法である。本法は、汎用の自動分析機に対応でき、正確、迅速かつ多検体処理を必要とする日常検査に容易に適応できる方法である。

謝 辞

本法の評価に当たり、Centers for Disease Control and PreventionのDC法を実施して頂いたCholesterol Reference Method Laboratory Networkの一員である大阪府立健康科学センター 中村雅一先生に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 34 : 1345 ~ 1353, 1955.
- 2) Lees RS, Hatch FT : Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin containing buffer. *J Lab and Clin Med*, 61 : 518, 1963.
- 3) Hara I, Okazaki M : High performance liquid chromatography of serum lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 129 : 57 ~ 58, 1986.
- 4) 渡辺 富久子, 他 : PEG-6000により分離した , -リポ蛋白中コレステロールの酵素的測定. *臨床病理*, 28 : 60 ~ 62, 1980.
- 5) Burstein M, Scholnick H : Lipoprotein-polyanion-metal interactions. 11 : 67 ~ 108, 1973.
- 6) Yamaguchi T, et al. : Production and Properties of Lipase from a Newly Isolated Chromobacterium. *Agric Biol Chem*, 37 : 999 ~ 1005, 1973.
- 7) 辻岡 直良, 他 : コレステロール脱水素酵素紫外部エンドポイント法を利用した血清総コレステロール測定法の開発. *生物試料分析*, 21 : 249 ~ 256, 1998.
- 8) Kayamori Y, et al. : Endpoint colorimetric method for assaying total cholesterol in serum with cholesterol dehydrogenase. *Clin Chem*, 45 : 2158 ~ 2163, 1999.
- 9) Hakala MT, Glaid AJ, Schwert GW : Kinetics and specificity of lactic dehydrogenase. *Federation Proc*, 12 : 213, 1953.
- 10) 桜井 強 : コレステロール脱水素酵素を用いたUV-End法による総コレステロール測定の基礎的検討. *医学検査*, 47 : 747 ~ 752, 1998.
- 11) Warnick GR, Benderson J, Albers JJ : Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high density lipoprotein cholesterol. In : Cooper GR, ed. *Selected methods of clinical chemistry*, 10 : 91 ~ 99, American Association of Clinical Chemistry, Washington, DC, 1983.
- 12) Denmacker PNM, et al. : Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum : comparison of six isolation methods combined with enzymatic cholesterol analysis. *Clin Chem*, 26 : 1780 ~ 1786, 1989.
- 13) Donald A, Warnick GR : Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol Concentration, In : Rifai N and Warnick GR, ed. *Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins*, 91 ~ 105, American Association of Clinical Chemistry, Washington, DC, 1994.
- 14) Thomas JB, Bryan B Jr. : New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions. *Clin Chem*, 23 :

- 2089 ~ 2098, 1977.
- 15) Uwajima T, Terada O : Purification and Properties of Extracellular Cholesterol Ester Hydrolase of *Pseudomonas fluorescens*. *Agr Biol Chem*, 39 : 1511 ~ 1512, 1975.
- 16) Roeschlau P, Bernt E, Gruber W : Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem*, 12 : 403 ~ 407, 1974.
- 17) 日本動脈硬化学会高脂血症診療ガイドライン検討委員会 : 高脂血症診療ガイドライン. *動脈硬化*, 25 : 1 ~ 34, 1997.
- 18) 秦 葭哉, 他 : 高脂血症診療ガイドラインをめぐって. *動脈硬化*, 26 : 217 ~ 239, 1999.
- 19) 岸 浩司, 他 : 生体試料中の物質の分析方法及びこれらに用いられる試薬, 特許第 3251304 号/ WO98/59068.
- 20) 岸 浩司, 他 : 生体試料中の物質の分析方法, 特願平 11-602641/ WO00/ 52480.
- 21) Dutcher JD, Wintersteiner O : Studies on the Wolff-Kishner reduction of steroid ketones. *J Am Chem Soc*, 61 : 1992 ~ 2000, 1939.
- 22) 辻岡 直良, 他 : コレステロール脱水素酵素-UV エンドポイント法を利用した血清コレステロール測定法 - 反応生成物コレステノンの捕捉効果 -. *臨床化学*, 21 : 131b, 1992.
- 23) 松本祐之, 森下芳孝, 深津俊明 : コレステロールデヒドロゲナーゼ-UV 法. *臨床検査*, 41 : 1033 ~ 1038, 1997.

Automatic HDL-Cholesterol Test Kit without Ultracentrifuge Procedure

Koji KISHI, Tsutomu KAKUYAMA, Koji OCHIAI, and Yoshifumi WATAZU

Product Development, Sysmex Corporation,
1-1-2, Murotani Nishi-ku, Kobe 651-2241.

SUMMARY

The HDL-cholesterol assay procedure includes tedious centrifugation, so it has not worked on automated analyzers. Therefore, we have developed a new homogeneous assay kit for HDL-cholesterol; (HDL-C Reagent-KL “Kokusai”) which does not need centrifugation.

The principle of HDL-cholesterol assays is as follows; HDL-cholesterol assay is based on *Chromobacterium* CE hydrolysis cholesterol on HDL and VLDL but not on LDL.

CE converts the cholesterol esters in HDL to free cholesterol. The resulting free cholesterol is oxidized by CDH to delta-4-cholesten-3-one, and generates NADH quantitatively. The NADH corresponds to HDL in serum. The lyophilized pooled human serum is used as the calibrator in this homogeneous method.

This assay is performed on the Hitachi Model 7170 automated analyzer (HITACHI, Japan), under the following condition; 4μL sample, 180μL of the first reagent, 60μL of the second reagent and absorbance at 340/570 nanometers.

The performances of the new homogeneous HDL-C assay were evaluated. Among-run imprecision (n=20) CV for control serum (52.4mg/dL) was 1.2%. Linearity was observed up to 150 mg/dL. Reducing substances such as bilirubin, ascorbate, hemoglobin, etc did not interfere with the measurement. The correlation between the HDL-C assay (y) and the designed comparison method (x) using fresh serum (n=53) was $y=0.94x+2.50\text{mg/dL}$, $r=0.998$.

Conclusion: This new homogeneous HDL-C method is easily applicable to automated analyzers, satisfying the requirement for routine HDL-cholesterol analysis, it could replace the common separation method using polyethylene glycol or polyanion-divalent cationic and current ultracentrifugation method. This new homogeneous HDL-C method could contribute to the examinations for risk-factor of arteriosclerosis, ischemic heart disease, etc. in the clinical laboratories.

Key Words HDL-Cholesterol, CDH-UV Method, Homogeneous Method
