リントングステン酸-MgCl₂ 沈殿法による HDL-cholesterol 測定とその意義*

櫻 林 郁之介**

河 合

忠**

山 中 桓 夫***

坂 本 美 一****

笠 原

靖*****

I. 結 言

HDL-cholesterol (以下 C-HDL) の測定法に関しては種々の方法が発表され、検討されているが、沈殿剤を加えて C-HDL を測定する、いわゆる沈殿法についても未だ定説をみない。また HDL 中のコレステロール発色に関しても種々の測定法が使用され、いくつかの問題が指摘されている。

今回われわれは沈殿剤としてリントングステン酸 (以下 pH_T) と MgCl₂ の組み合わせ¹⁾を用いて HDL を分離し、コレステロール発色剤として酵素法を用いることにより、精度よく測定できることが判明したので基礎的検討成績と共に報告する。

II. 検 討 方 法

(1) pH_T-MgCl: 血清 200μl に 4% pH_T, 2M MgCl₂ 混合液 20 μl を加え (8 倍希釈沈殿液とした場合は 200 μl) 1,500G 10 分遠心後、その上清 50 μl をコレステロール酵素測定法にて測定し、係数をかけて C-HDL 値とする。

(2) 超遠心法: 小型超遠心機 (Airfuge, Beckman) を用いて、血清 100 μl に kBr を加え比重 1.063 に調整し、さらに kBr にて 1.063 とした溶液 75 μl を重層し、2.5 時間 160,000G で遠心後下層 100μl を採取し、コレステロール酵素測定法にて測定し、C-HDL 値を求める。

III. 検 討 成 績

1. pH_T-MgCl₂ 沈殿剤の検討

pH_T と MgCl₂ の至適濃度を設定するため、まず pH_T を 4% としたときの Mg⁺⁺ 濃度の変化による沈殿後上清中のコレステロール濃度を測定すると、Fig 1. に示すように、pH 依存性があるが、中性付近では少なくとも Mg⁺⁺ の最終モル濃度が 20~45 mM の間で C-HDL 値は安定で、上清の電気泳動法の検討でも他のリポ蛋白の混入を認めていない。またこの C-HDL 値安定個所では pH 6.5 において超遠心法の値と一致していることを確認した。さらに Mg⁺⁺ の濃度を一定にし、pH_T 濃度を変化させても同様の結果が得られたため、以後われわれは pH_T, および MgCl₂ の最終濃度をそれぞれ 0.356%, 36 mM と設定した。なお、血清量と沈殿剤添加量の比は 10:1, 高トリグリセライド血症の場合は 8 倍に希釈した沈殿剤を 1:1 の割合で添加することとした。

また各種沈殿剤での変化をみたのが Fig. 2 であるが、Mn⁺⁺ は HDL 以外のリポ蛋白の沈殿が起これにくいことを示しているが、Mg⁺⁺, および Ca⁺⁺ は同様の結果であった。図中 UC は超遠心法による C-HDL 値、(一)は交流電気泳動法により他のリポ蛋白の混入を認めないことを示している。

2. 超遠心法との相関と測定精度

以上の検討結果から設定した条件に基づき pH_T-MgCl₂ 沈殿法による C-HDL 測定と超遠心法との相関をみると Fig. 3 に示すように相関係数 0.986, 回帰式 $y=1.11x-5.40$ と良好な相関を示し

* 1979年6月、第11回日本動脈硬化学会において発表

** 自治医科大学臨床病理学

*** 自治医科大学消化器内科

**** 自治医科大学内分泌代謝科

***** 富士臓器製薬中央研究所

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

た。また本法の10回同時再現性はCV0.9~2.0%ときわめてよい。

3. 妨害物質の影響

コレステロール酵素発色剤を用いる場合、沈殿

剤による阻害や正誤差が問題になるが、われわれは発色剤からコレステロールオキシダーゼを除いた系を作成し測定したが、いずれも影響のないことが判明した。

また最も問題となるビリルビンの影響については、高ビリルビン血症のC-HDL値を各種のコレステロール測定法を用いて測定したがZurkowski法が強い影響を受けるのに比較し酵素法(505 nm)では少なくともビリルビン値が7~8mg/dlまでは影響を受けないことを確認した。

4. HDLの保存条件

沈殿法におけるリポ蛋白の保存条件が問題になるが、まず4°C保存では3日以降でC-HDL値の低下を来す。-20°C保存では少なくとも2ヶ月間は安定であり、沈殿法によるC-HDL測定に関しては-20°C保存が最適と考えられる。

IV. 考察および結語

われわれの検討したpH-T-MgCl₂沈殿法によるC-HDL測定法は精度もよく、コレステロール酵素測定法の併用が十分行ない得ることが判明し、C-HDL測定のスクリーニングとして十分日常臨床検査に取り入れられるものとする。ただ、従来の血清コレステロール測定に比較し、C-HDLは低濃度域での測定となるため、検体量を比較的多く必要とするが、われわれは高感度コレステロール酵素測定法の開発に成功²⁾しており、微量検体でも測定可能な方法として現在検討中である。

文 献

- 1) 櫻林郁之介, 須藤久美子, 林明德, 河合忠, 能登英明, 川名廣明: 沈殿法におけるHDL-コレステロール測定法の基礎的検討ならびに臨床的意義。臨床病理, 26補: 202 (1978).
- 2) I. Sakuraabyashi, K. Sudo, T. Kawai, M. Sugiyama, & Y. Kasahara: New method of measuring high density lipoprotein level with higher sensitivity. 1st South East Asian & Pacific Congress of Clinical Biochemistry Oct. (1979). (Singapore)

討 論

質問 高松 滋（弘前大学脳卒中研）

新しい酵素法によるコレステロールの測定原理に基づいたリポ蛋白電気泳動分析と沈殿法による測定成績との関係はいかがでしょうか。

回答 桜林郁之介

1) 電気泳動法による LDL, HDL 同時測定を行なう方法において、コレステロール発色系に Formazan 形成を行なう方法でも同様に、酵素剤を従来の血清コレステロール測定の量の 5~6 倍

に濃縮して用いていますが、酵素阻害などの問題はみられません。超遠心法ともよく関連し、沈殿法との関連もよいようです。

2) 私どもが先に発表しましたオゾン化シッフ染色法や、脂溶性色素を用いたりポ蛋白分画法と Formazan 色素を用いたコレステロール発色とは、その染色原理から考えて、必ずしも関連はしないと思われますが、一考の余地はあります。

Summary

Precipitating Method for HDL-Cholesterol Quantitation by Phosphotungstate-MgCl₂ and its Clinical Study

Ikunosuke SAKURABAYASHI, Tadashi, KAWAI, Takeo YAMANAKA*,
Yoshikazu SAKAMOTO**, Masami SUGIYAMA*** and Yasushi KASAHARA***

Department of Clinical Pathology, *Department of Gastroenterology, **Department of Endocrinology,
Jichi Medical School. ***Research Laboratories, Fuzizoki Pharmaceutical Co.

We describe a modified phosphotungstate-MgCl₂ procedure for high-density-lipoprotein (HDL)-cholesterol quantitation, especially by use of an enzymatic reagent.

In the present study, we found that an enzymatic cholesterol reagent can be used for HDL-cholesterol measurement without interaction of magnesium ion, influence of bilirubin, and ascorbic acid. When we compared the values of cholesterol

content in HDL obtained by ultracentrifugal separation and phosphotungstate-MgCl₂ precipitation, correlation coefficient was 0.968 (slope, 1.11, y-intercept -5.40).

Our precipitation technique is more appropriate for routine clinical laboratory use.

Key words: phosphotungstate-MgCl₂, precipitating method, HDL-cholesterol, enzymatic cholesterol reagent, ultracentrifugation