

# 固相化リポソーム結合磁気ビーズ法を用いた コレステロール引き抜き能評価法の開発

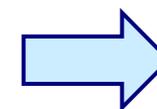
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科  
先端分析検査学分野 教授 大川 龍之介

2022年12月8日

## 世界と日本における死因

	世界 (WHO 2019)	(%)	日本 (厚労省 2020)	(%)
1 <sup>st</sup>	心疾患	16	悪性新生物	28
2 <sup>nd</sup>	脳血管疾患	11	心疾患	15
3 <sup>rd</sup>	COPD	6	老衰	10

心疾患・脳血管疾患を克服することが世界の課題



脂質異常症

# コレステロール検査を指標とした治療の試み

LDLコレステロール(LDL-C)

$\geq 140$  mg/dL\*

- スタチンによって LDL-C を 39 mg/dL 減少させると 21% リスクが低下. Lancet (2010) 376: 1670-81

➡ 70% 以上の残余リスク

HDLコレステロール(HDL-C)

$\leq 40$  mg/dL\*

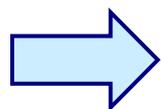
- CETP阻害剤(トルセトラピブ, アナセトラピブ, ダルセトラピブなど)によって, いずれもHDL-Cを増加させたが, リスクの軽減に効果なし

NEJM (2007) 357: 2109-22

NEJM (2010) 363: 2406-15

NEJM (2012) 367: 2089-99

LDL-C, HDL-C検査 は粥状動脈硬化の進展を十分に反映できていない



上記を補填する検査の開発が求められている

\*脂質異常症診断基準 日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2022年版」

CETP: コレステリルエステル転送蛋白

# HDLの多様性 ~ 量から質の検査へ ~

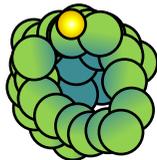


8 - 12 nm

HDL

密度: 1.063 - 1.210 g/mL

分子量: 約10万



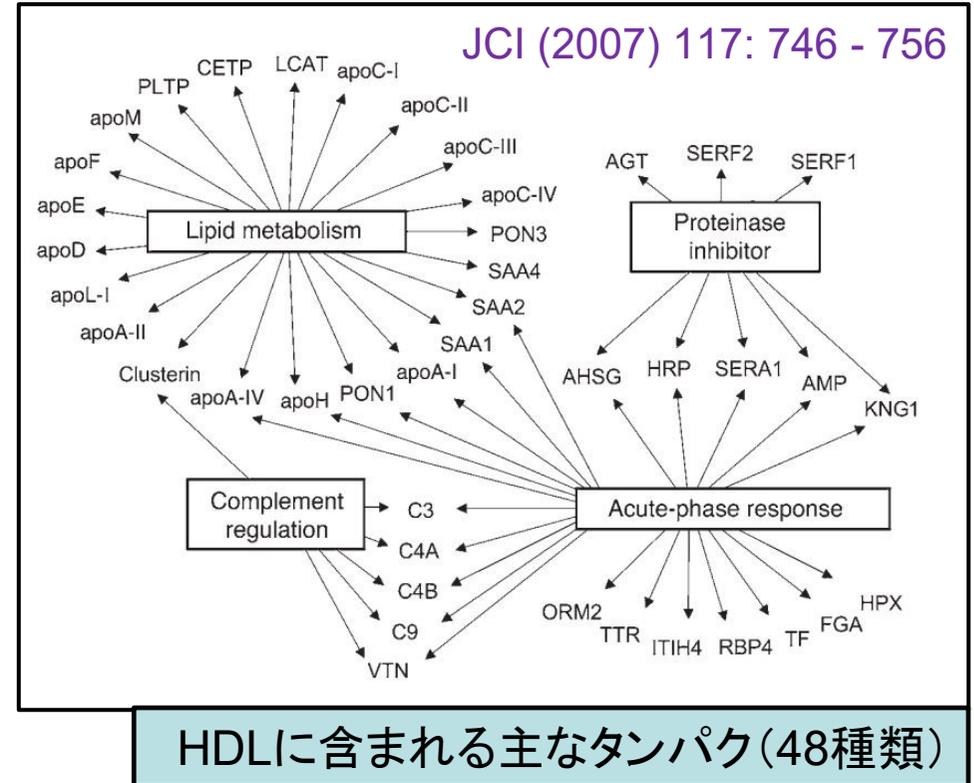
HDL<sub>2</sub>



apoE-  
containing  
HDL



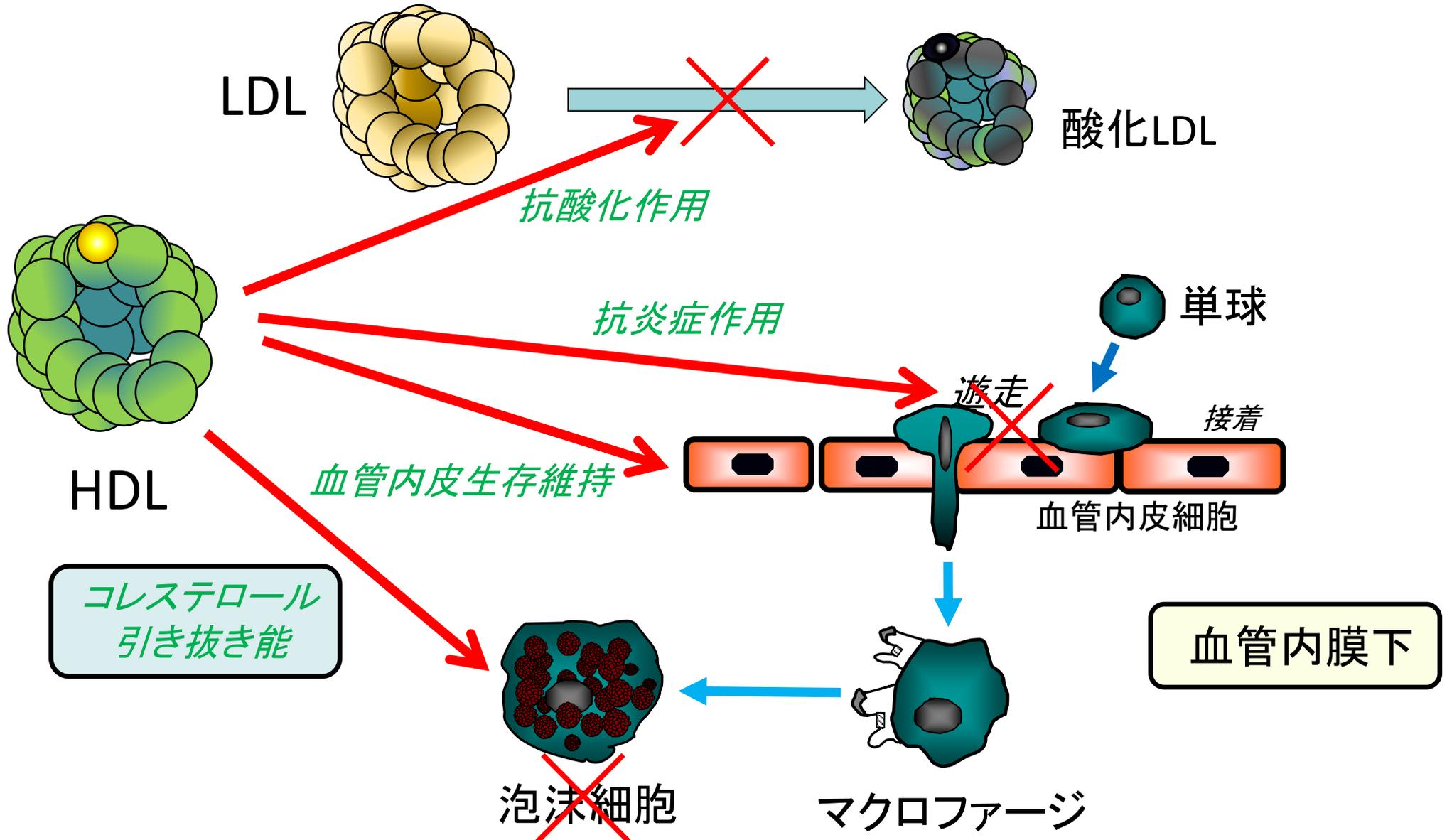
HDL<sub>3</sub>



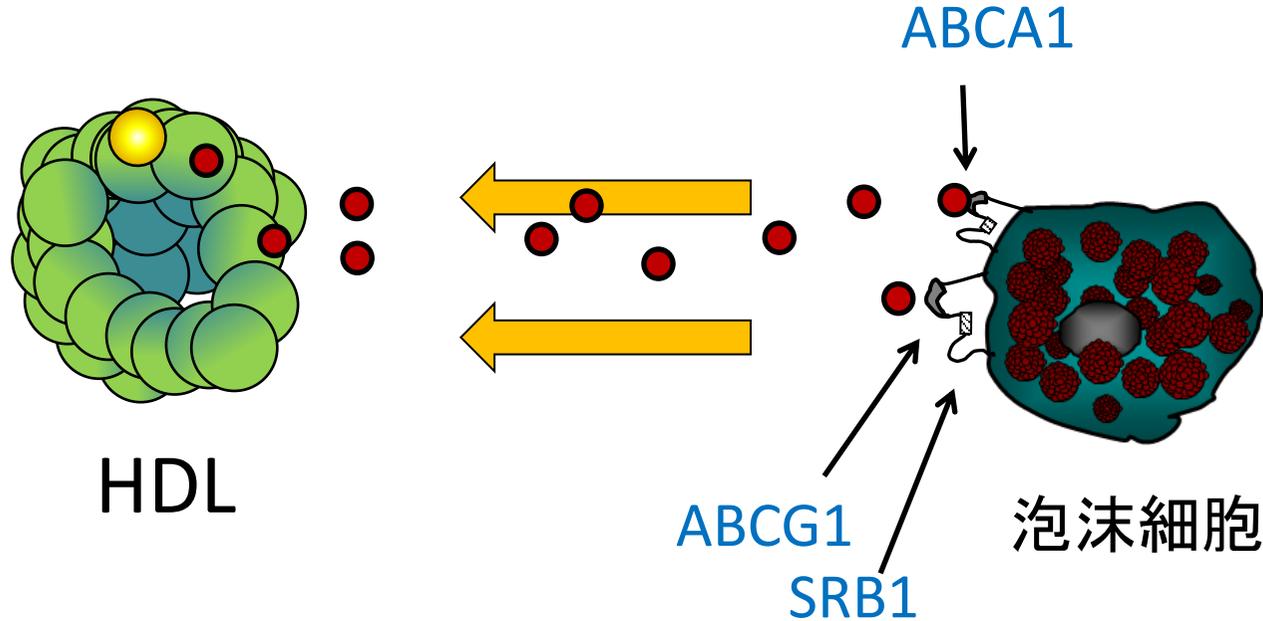
HDLは単一な粒子ではなく、性質・機能の異なる様々な粒子の総称  
→ コレステロールでHDL総量を測定するだけでは不十分

HDLは量ではなく質(機能)で評価する

# HDLの多彩な抗粥状動脈硬化能



# コレステロール引き抜き能(CEC)とは



プラークの元となる泡沫細胞への分化を防ぐHDLの重要な機能

ABC : ATP-binding cassette transporters  
CEC : cholesterol efflux capacity

# CECを評価することの有用性

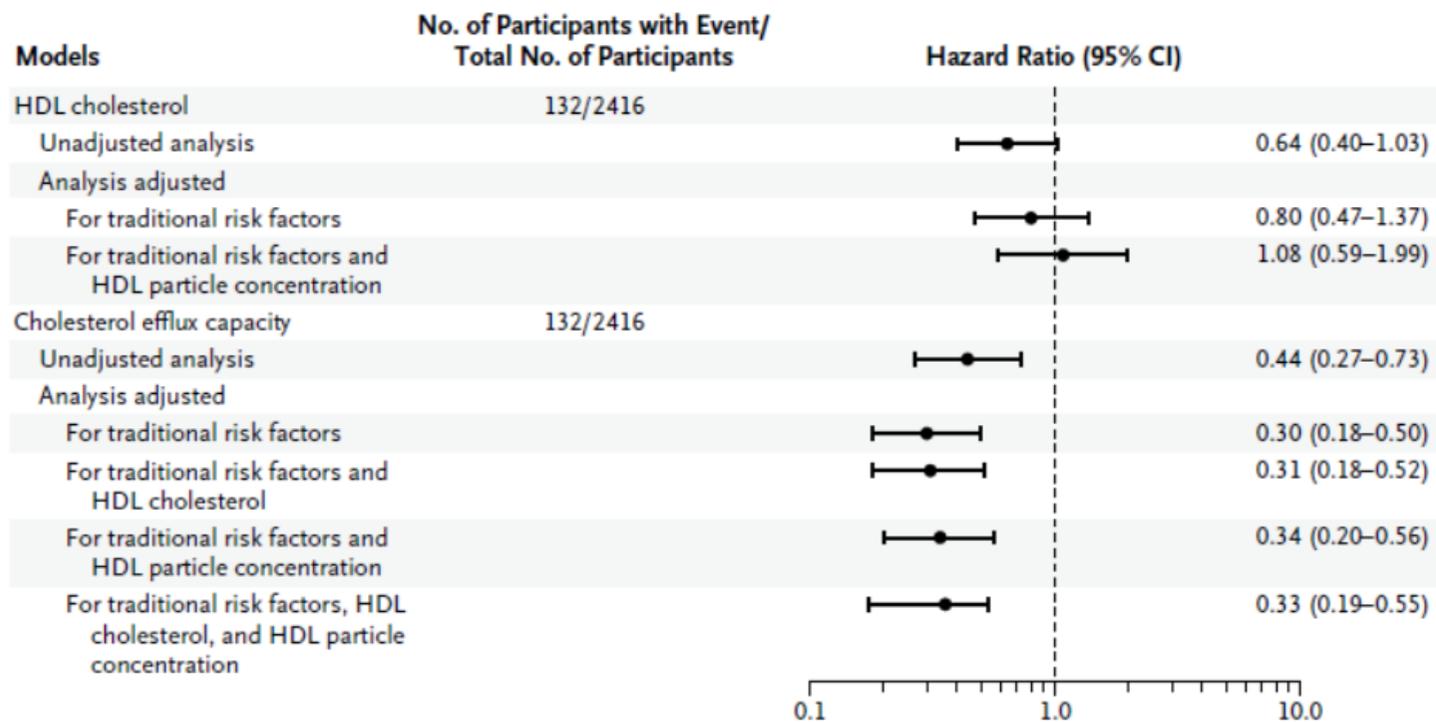
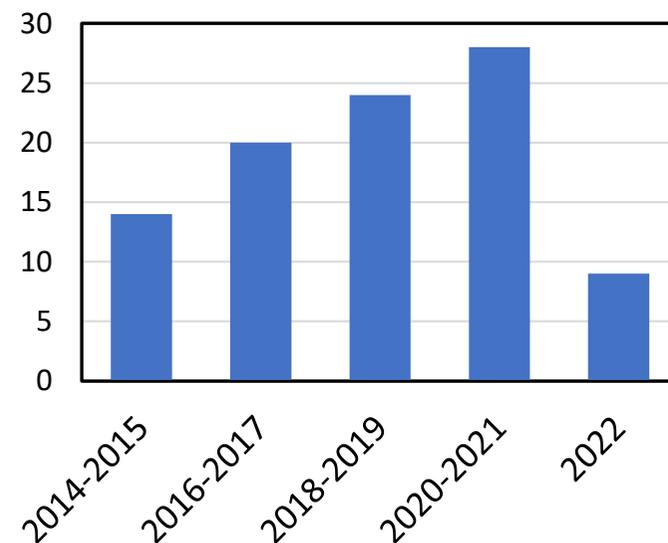


Figure 1. Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events, According to Models Based on High-Density Lipoprotein (HDL) Cholesterol Level and Cholesterol Efflux Capacity.

Rohatgi et al. N Engl J Med. 2014; 371; 2383-93

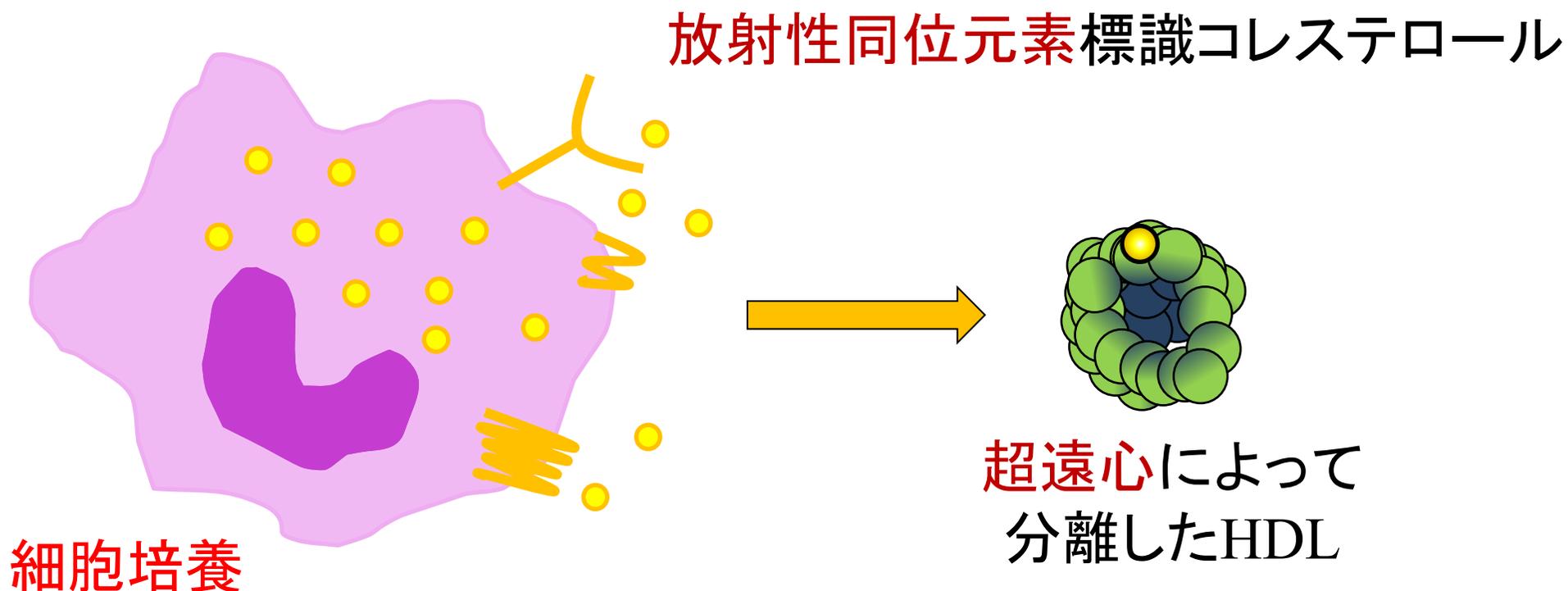
Lancet Diabetes Endocrinol (2015)  
Circulation (2017)  
ATVB (2019)  
PLoS One (2021)

CEC を評価した  
臨床研究の論文数 (Pubmed)



CEC測定の有用性は多くの臨床研究で**実証**されている

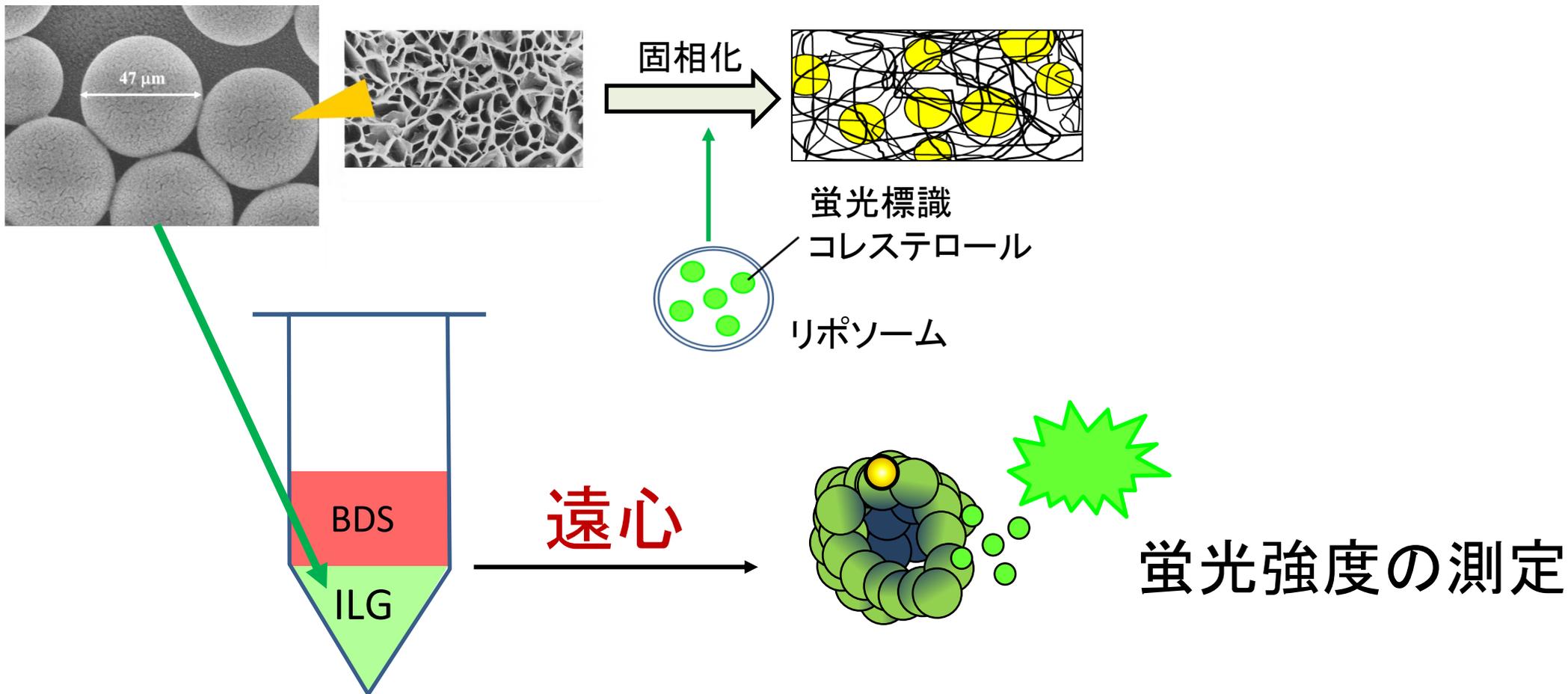
## 従来のCEC評価法の問題点



細胞培養，放射性物質，超遠心を必要とする従来法は臨床応用が困難

# ILG法の開発

Horiuchi et al. Biosci. Rep. 2018; 38(2): BSR20180144

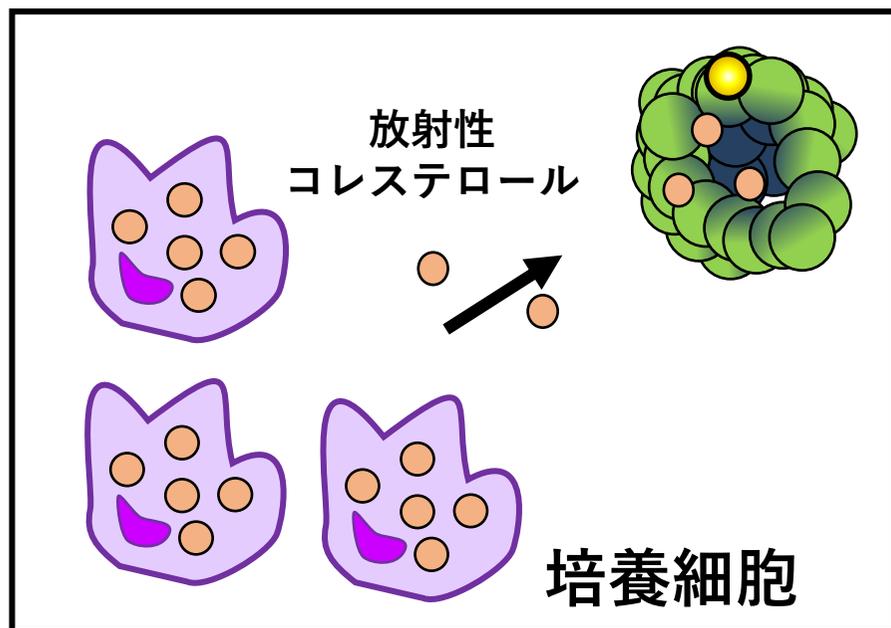


蛍光コレステロールをビーズに固相化し, CECを評価

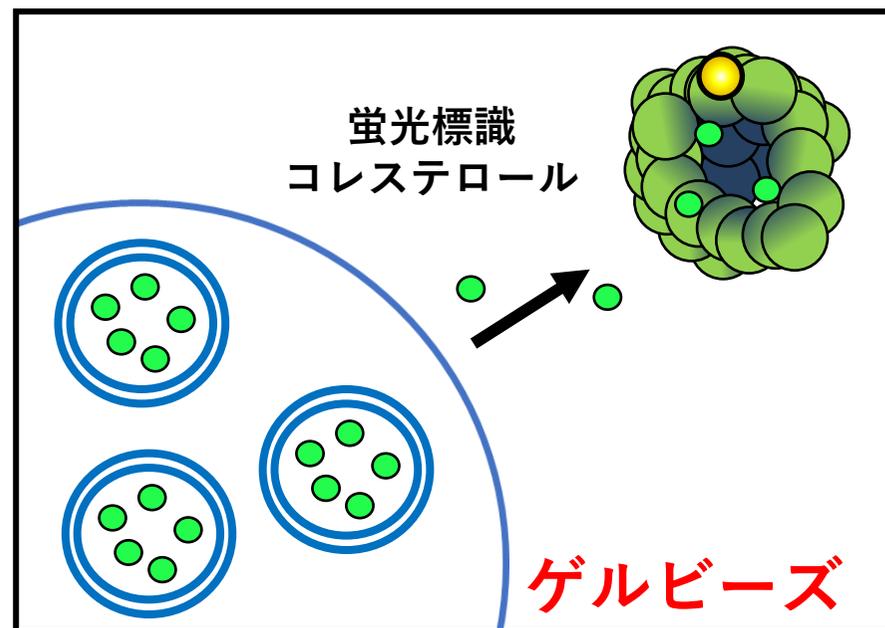
ILG : 固相化リポソーム結合ゲルビーズ    BDS : apoB関連リポタンパク除去血清

# ILG法の開発

## 従来のCEC測定法



## ILG法



放射性コレステロール



蛍光標識コレステロール

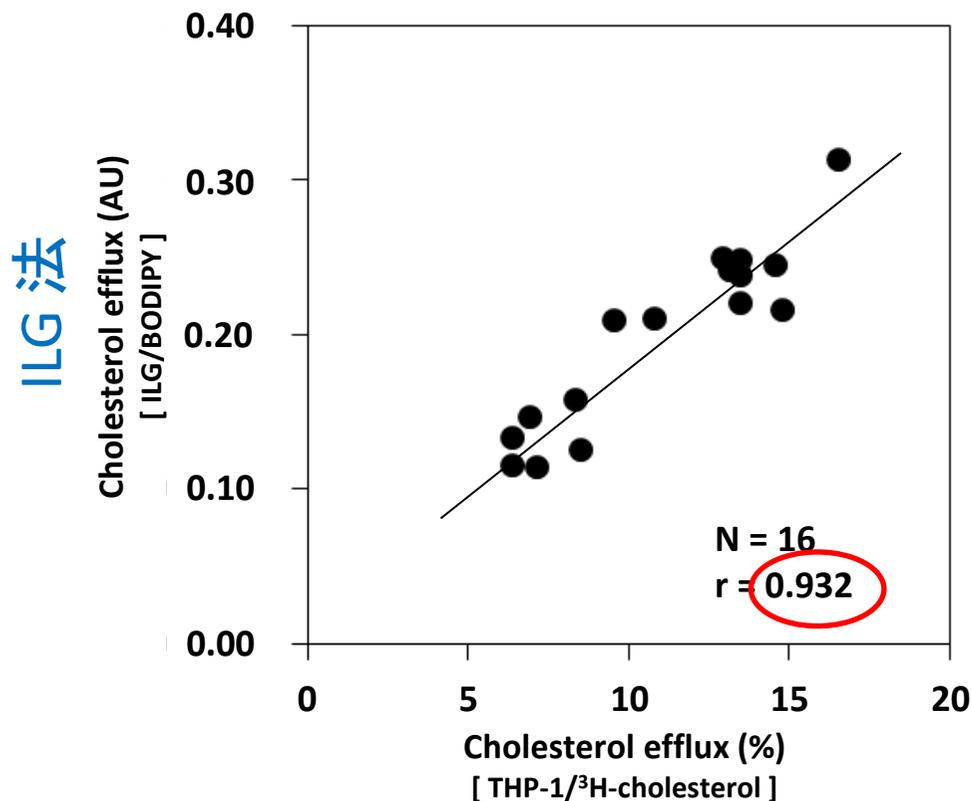
培養細胞



ゲルビーズ

安全・簡便・高精度・測定時間の短縮

## 従来法(細胞法)との相関

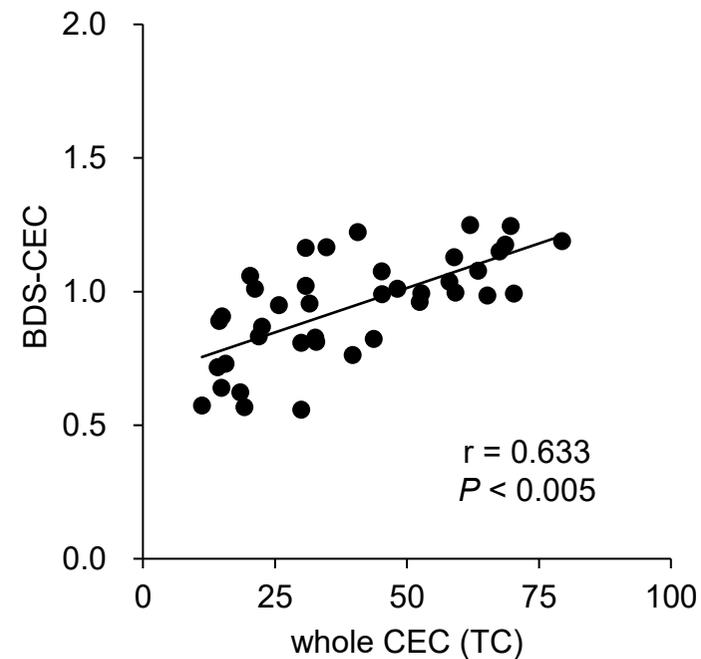
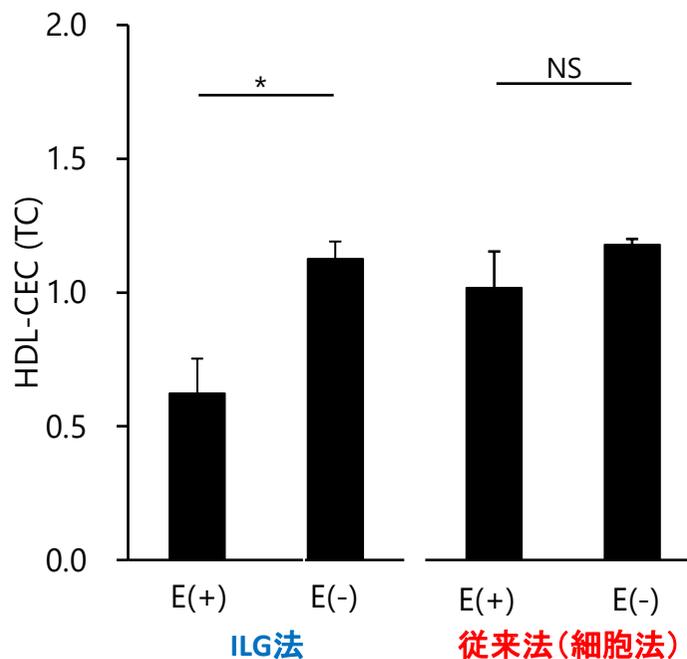
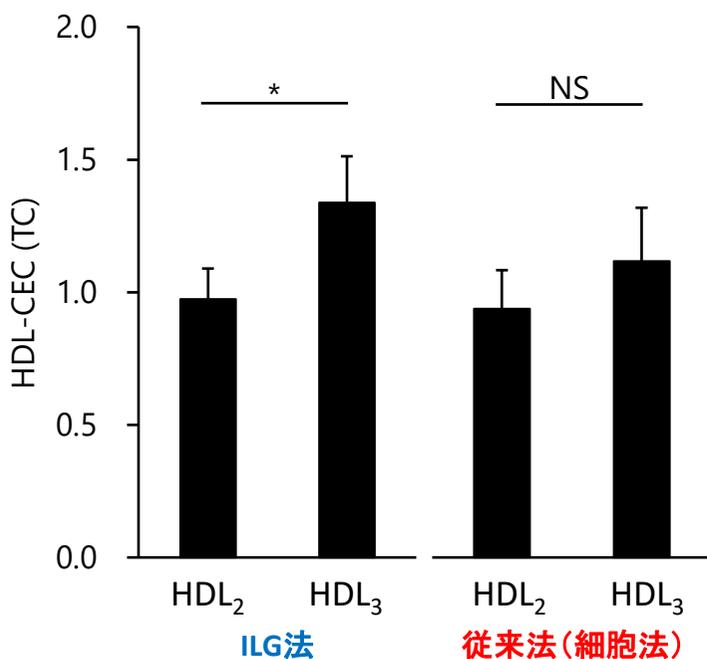


従来法(細胞法)

Horiuchi et al. Biosci. Rep. 2018; 38(2): BSR20180144

ILG法は従来の細胞を用いた方法とよく相関する

# HDLへの特異性



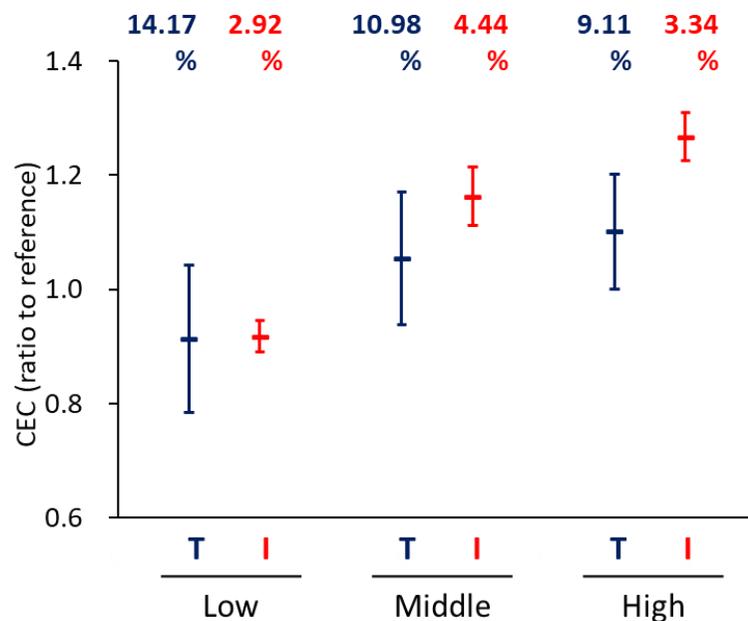
Horiuchi et al. Biosci. Rep. 2019; 39(4): BSR20190213

Horiuchi et al. Biosci. Rep. 2020; 40(8): BSR20201495

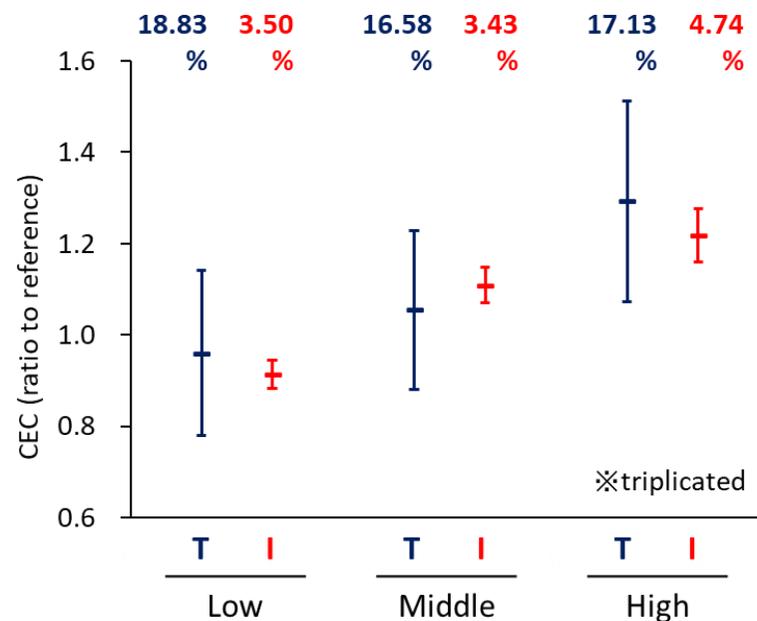
ILG法はHDLの引き抜き能を反映している

# ILG法の開発

同時再現性 (n = 20)



測定間再現性 (n = 20)



mean ± SD

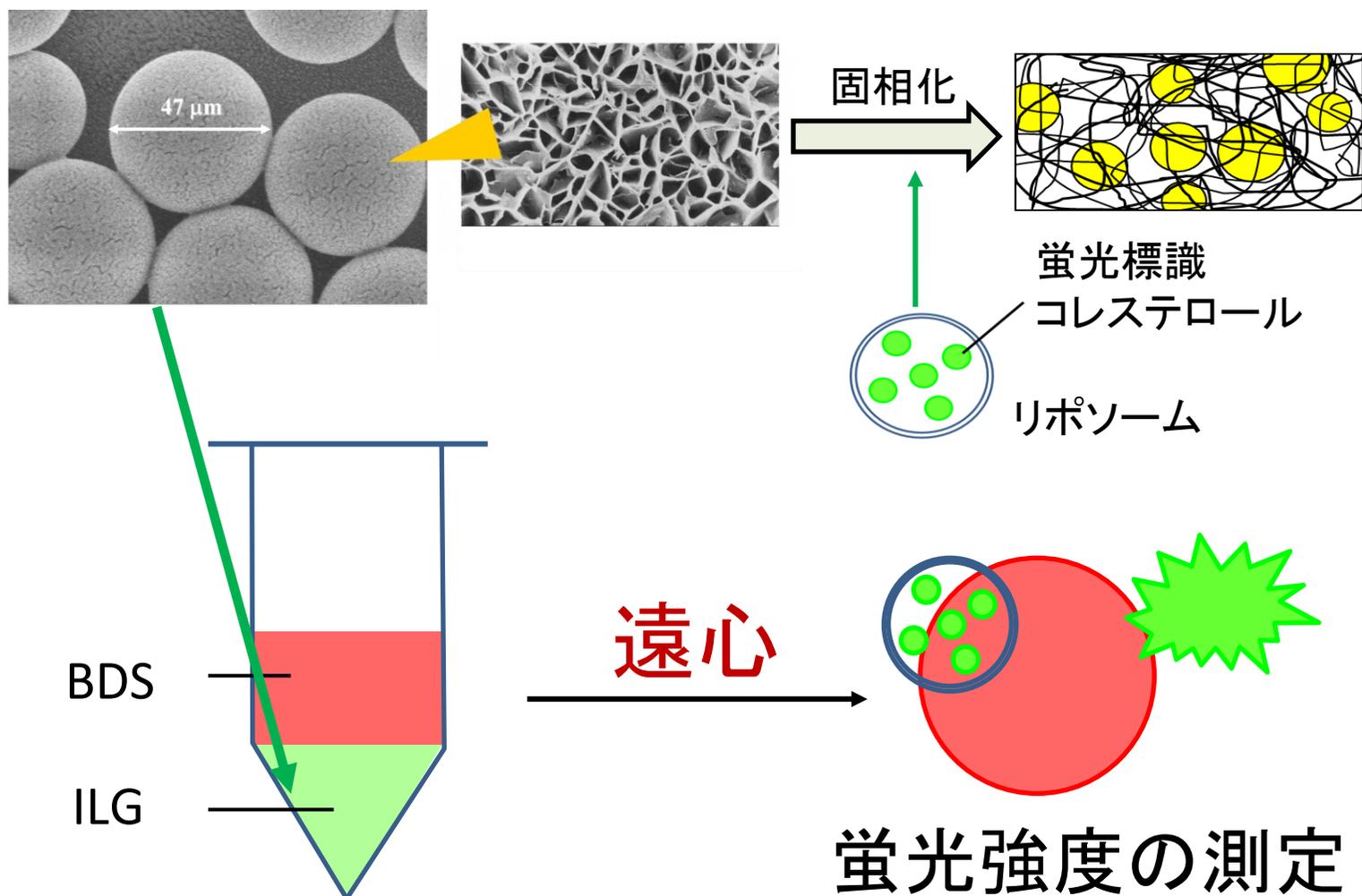
T: 従来法(細胞法)

I: ILG法

Horiuchi et al. Biosci. Rep. 2020; 440(8):BSR20201495

従来の細胞を用いた方法と異なり, 優れた再現性を有する

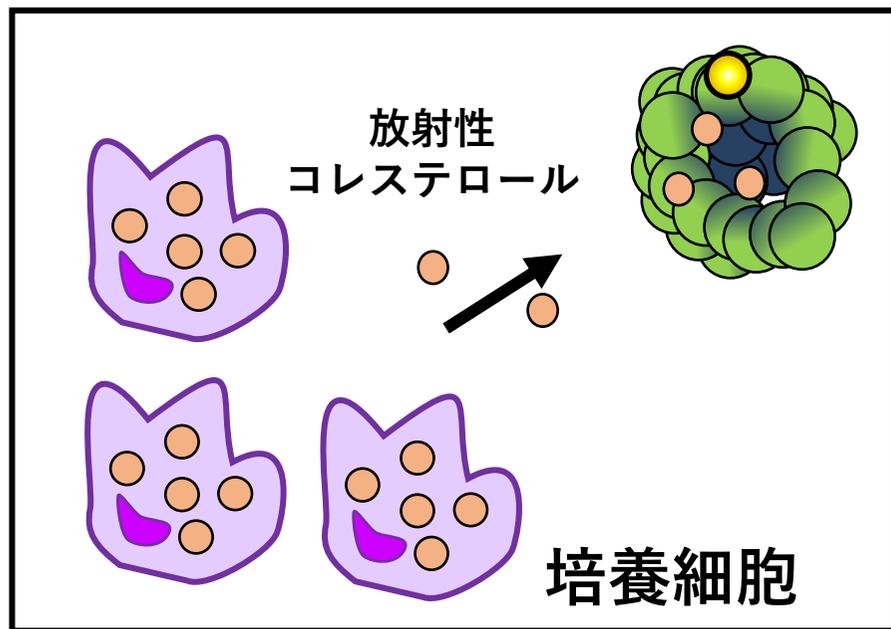
## ILG法の課題



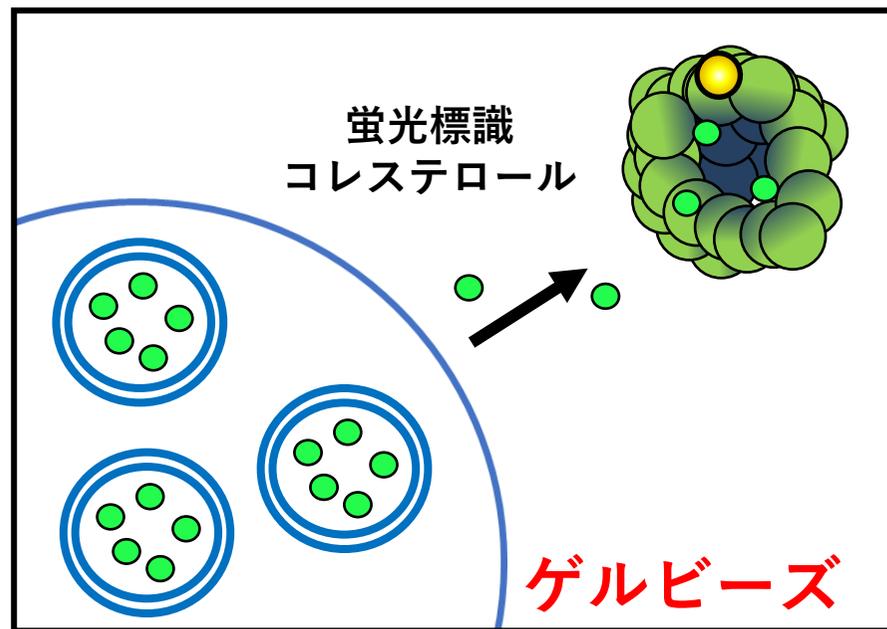
**遠心操作が必要**であり自動化が困難、  
臨床応用するのに煩雑な操作が含まれる

# ILG法の課題

## 従来のCEC測定法



## ILG法



放射性コレステロール



蛍光標識コレステロール

培養細胞



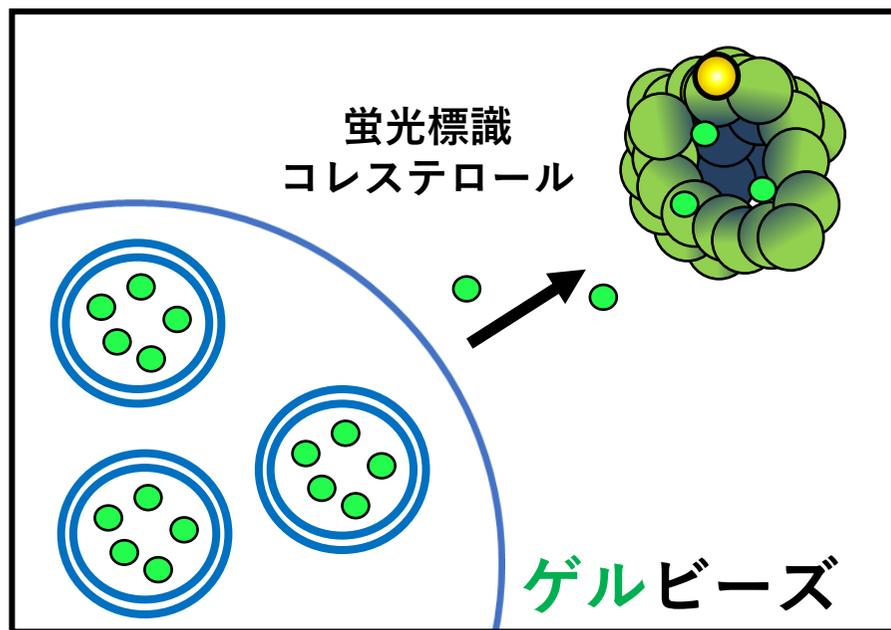
ゲルビーズ

遠心操作必要

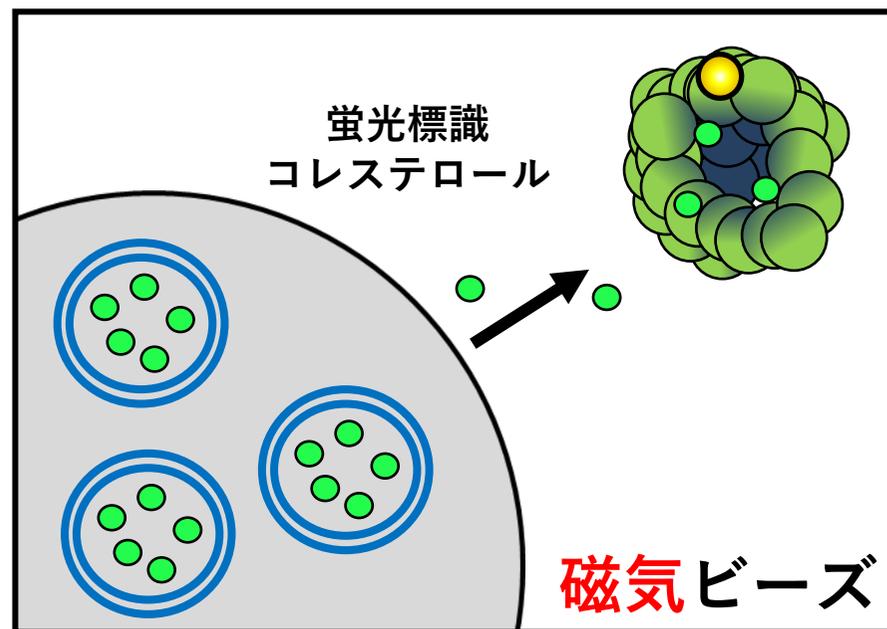
安全・簡便・高精度・測定時間の短縮

# さらにILG法からILM法へ

ILG法



ILM法



→ 蛍光標識コレステロール

→ ゲルビーズ

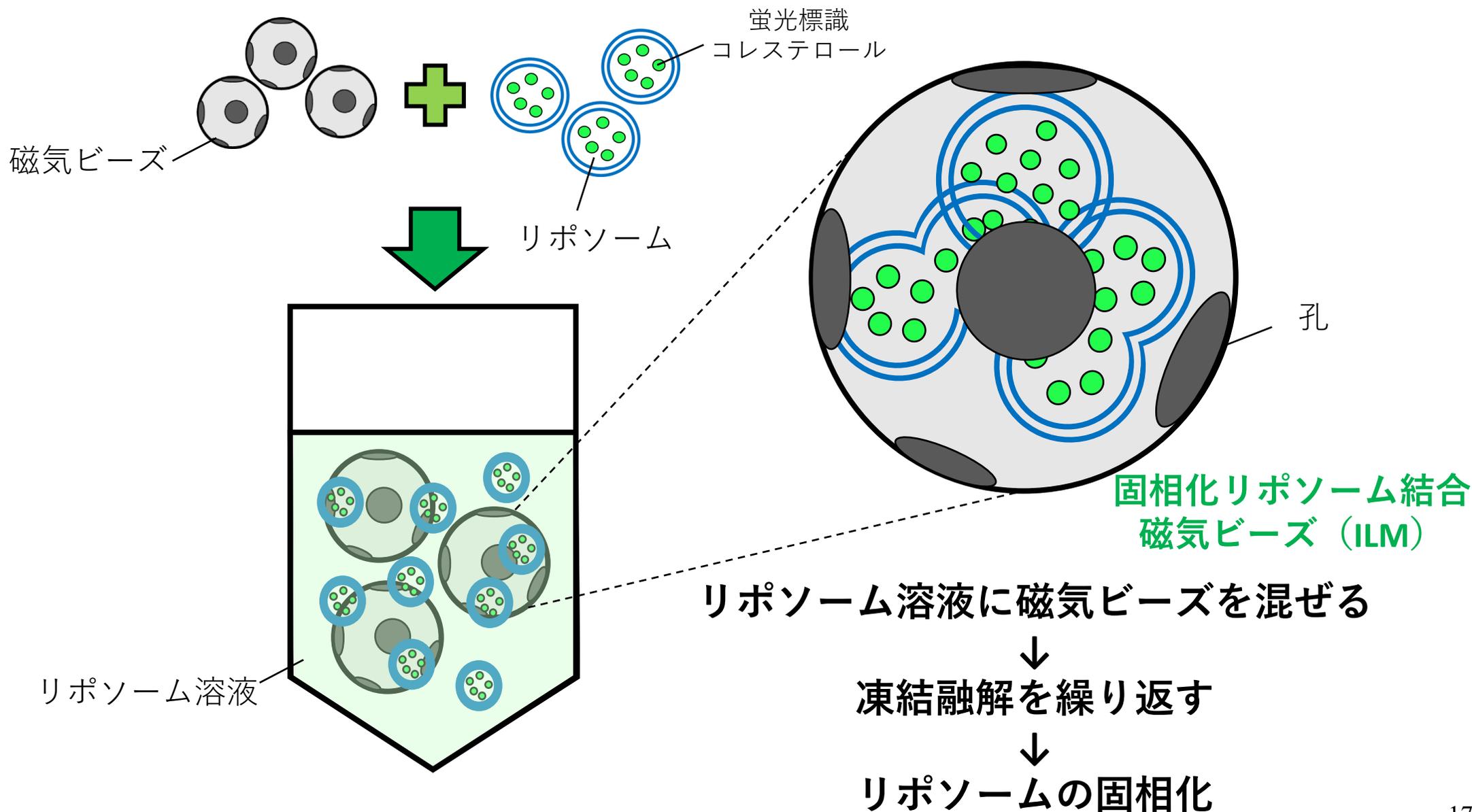
遠心操作**必要**

→ 蛍光標識コレステロール

→ 磁気ビーズ

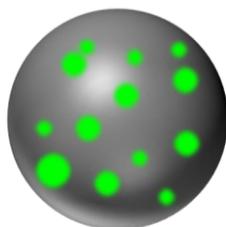
遠心操作**不要**

# 固相化磁気ビーズ (ILM) 作製方法



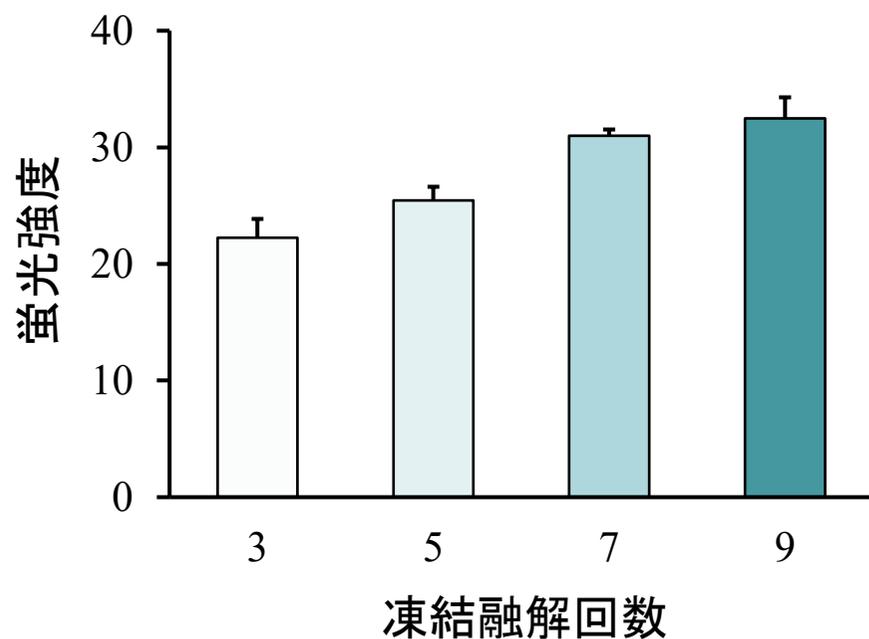
# 固相化磁気ビーズの安定性

〈イメージ図〉

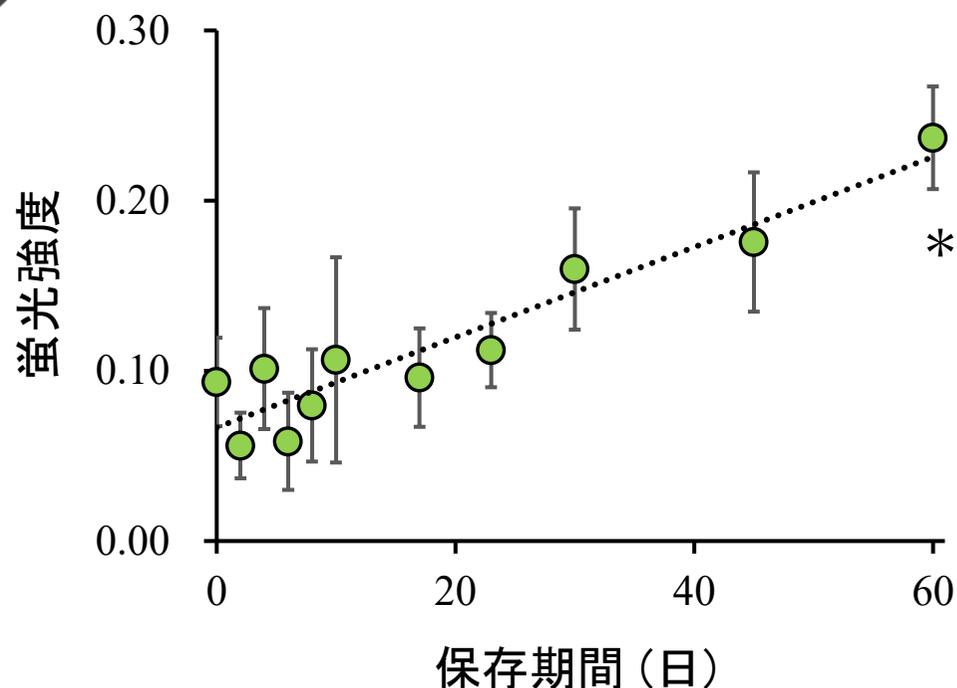


ILM

蛍光リポソームの磁気ビーズへの  
固相化量と凍結融解回数との関係

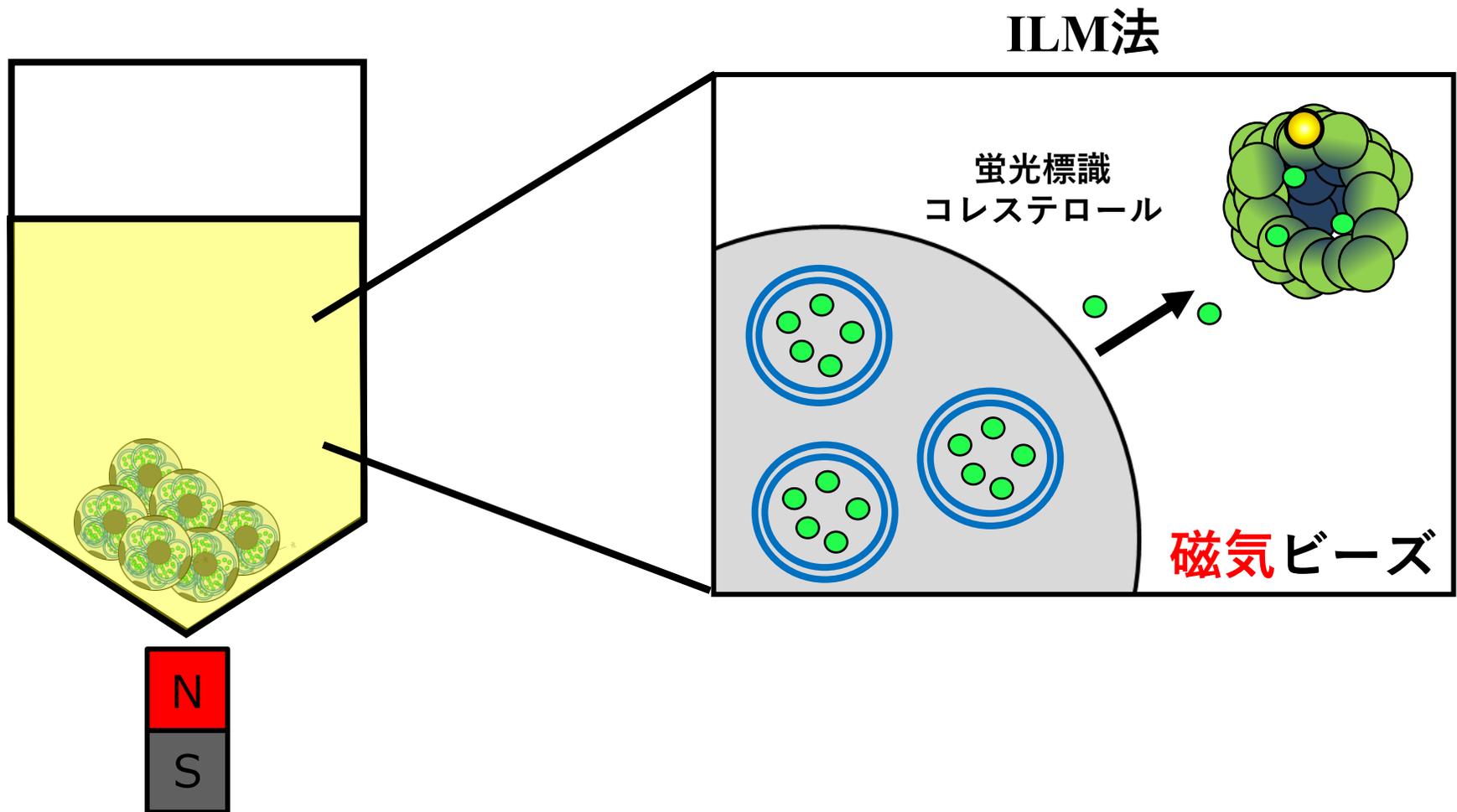


固相化磁気ビーズ  
長期保存後の上清の蛍光強度



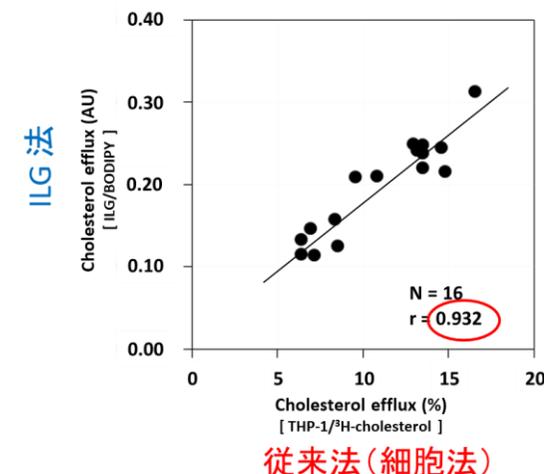
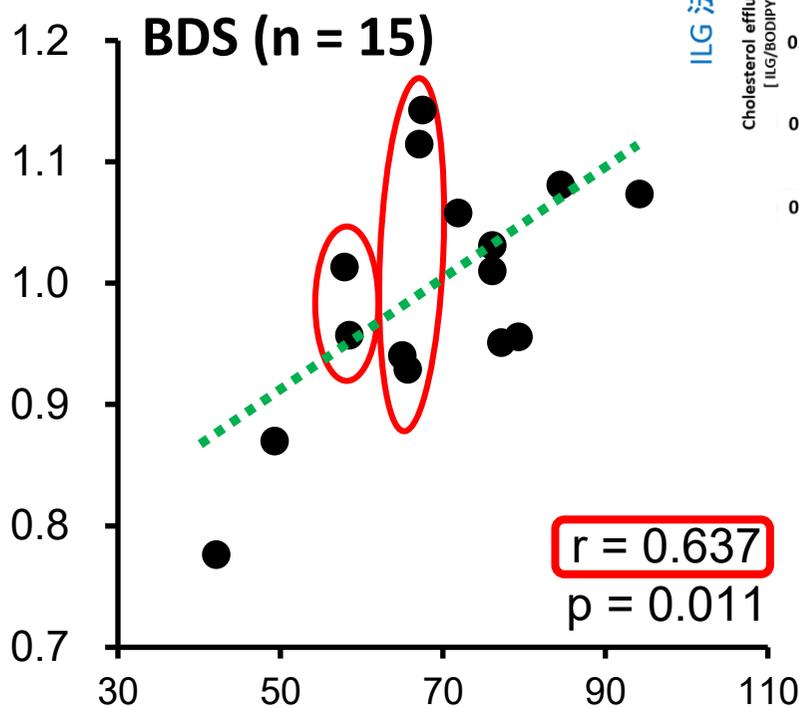
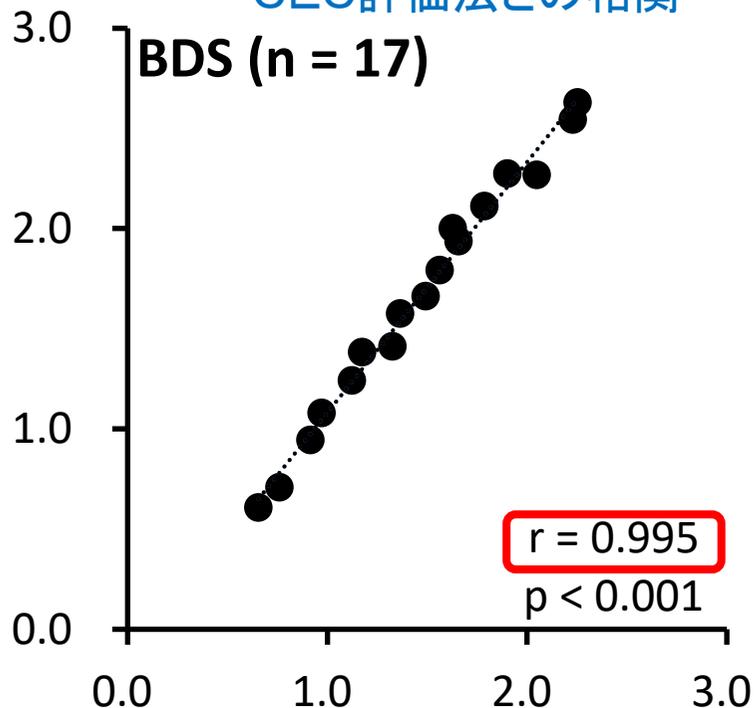
固相化磁気ビーズは45日間は安定であった

# ILMを用いたCEC測定



# ILM法とILG法・従来法（細胞法）との比較

本発明のCEC評価法とILGを用いた  
CEC評価法との相関



ILG法CEC

HDL-C (mg/dL)

ILM法とILG法は良好な相関性を示す。  
また、同程度のHDL-Cでも異なるCECが観察される

- 細胞を用いないビーズ法の開発により, 簡便, 短時間で高精度なCEC検査が可能
- 本法は従来法(細胞法)とよく相関し, HDLのCECを反映しているものと考えられる
- さらにILM法の開発により, ILG法では必須の自動化に不向きな遠心操作を必要とせず, 大量の試料処理に適したものとなっている
- 分析装置への実装のためには, さらなる測定時間の短縮が必要であるが, 現在, さらに改良し, 既に1時間までの短縮の目途がたっている. また, 臨床研究を実施中

- コレステロール引き抜き能検査の臨床的位置づけは世界的に確立しているため、Worldwideでの市場が見込める
- 磁気ビーズを用いた検査装置開発の技術を持つ企業との共同研究を希望
- コレステロール引き抜き能評価による脂質異常症の早期発見，健診事業への展開を考えている企業には，本技術の導入が有効と思われる

# 競合技術に対する優位性

方法	開発者	細胞	RI	測定時間	臨床検査	自動化	膜成分	抗体	コスト
細胞を用いたCEC	研究者多数	+	+/-	3日	不可	不可	細胞	無	高
CUC (取り込み能)	神戸大学/ シスメックス	-	-	17分	可	可	無	抗 ApoA-I	高
ILM法を用いたCEC	東京医科 歯科大学	-	-	短時間	可	可	リポソーム	無	安

## ILM法の特徴

- ・ 簡便, 短時間で高精度な検査が可能
- ・ 従来法と良好な相関性
- ・ リポソーム膜を介した受動拡散を測定(細胞法に近い)
- ・ 抗体を用いないため安価
- ・ 自動分析装置に搭載可能

## ILM法の用途

- ・ 病院における心血管疾患の発症リスクの予測マーカー
- ・ 治療後の血管内プラーク(粥腫)退縮効果の予測
- ・ 人間ドック, 健診などにおけるメタボ異常の指標

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称: 新規のコレステロール引き抜き能測定法
- 出願番号 : 特願2021- 94456, PCT/JP2022/022081
- 出願人 : 東京医科歯科大学
- 発明者 : 大川龍之介ら

### 問い合わせ先

東京医科歯科大学

オープンイノベーション機構 小川行平

e-mail [ogawa.tlo@tmd.ac.jp](mailto:ogawa.tlo@tmd.ac.jp)