

化学発光酵素免疫測定 (CLEIA) 法による 高分子量アディポネクチン濃度と 各種健康診断項目との関係

広瀬 寛* 石橋みどり** 菊池 春人**
河邊 博史* 村田 満** 齊藤 郁夫*

現代の高脂肪食や運動不足などにより、わが国においても内臓脂肪型肥満やインスリン抵抗性を基盤とした糖尿病、高血圧、脂質異常症、動脈硬化症といった生活習慣病が増加し、社会問題となっている¹⁾⁻³⁾。これらの生活習慣病の病態は、いずれも動脈硬化や心血管病の強力な危険因子である。しかも、これらの各因子は特定の個人に集積しやすく、これらの因子が重複するほど動脈硬化による心血管病のリスクが相乗的に高まることが知られている⁴⁾。したがって、インスリン抵抗性を正すことは、動脈硬化症や心血管病の予防や管理に際して非常に重要である。このような背景から、2005年4月に日本内科学会など8学会からメタボリックシンドロームの診断基準が発表された⁵⁾。メタボリックシンドロームの病態は、「LDL コレステロールまたは総コレステロールの高値はそれだけで独立した心血管病の危険因子だが、それ以外にも内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性を基盤として、耐糖能異常、中性脂肪 (TG) または HDL コレステロールの異常、血圧高値のうち2つ以上複合したのも、心血管病のハイリスクと考える」というものであった。今後、腹囲のカッ

トオフ値などが変更になる可能性はあるが、内臓脂肪蓄積の重要性を示したこの概念は大変重要であり、世界的にもそのような流れになっている⁶⁾。また、メタボリックシンドロームは、心血管病だけでなく糖尿病発症の前段階とも考えられているので、予防の対象としてその意義は大変重要である。

脂肪組織は長い間単なるエネルギーの貯蔵庫と考えられていたが、近年の研究の進歩によりアディポカインと呼ばれる種々の生理活性物質 (遊離脂肪酸 (FFA), TNF- α , レジスチン, レプチン, アディポネクチン, PAI-1, アンジオテンシノーゲンなど) を合成・分泌する場であることが明らかとなった¹⁾⁻³⁾ (図1)。それらの中で、インスリン抵抗性や動脈硬化症に関与すると考えられているものを中心に、肥満から動脈硬化症への介在因子を図2に示した。

アディポネクチン (ADPN) は脂肪細胞から分泌されるにもかかわらず、肥満者では血中濃度がむしろ低く⁷⁾、2型糖尿病患者や冠動脈疾患を合併した2型糖尿病患者ではさらに低いことが報告された⁸⁾。さらに、高度の肥満および糖尿病をきたすピマインディアンという民族に

* 慶應義塾大学保健管理センター

** 慶應義塾大学病院中央臨床検査部

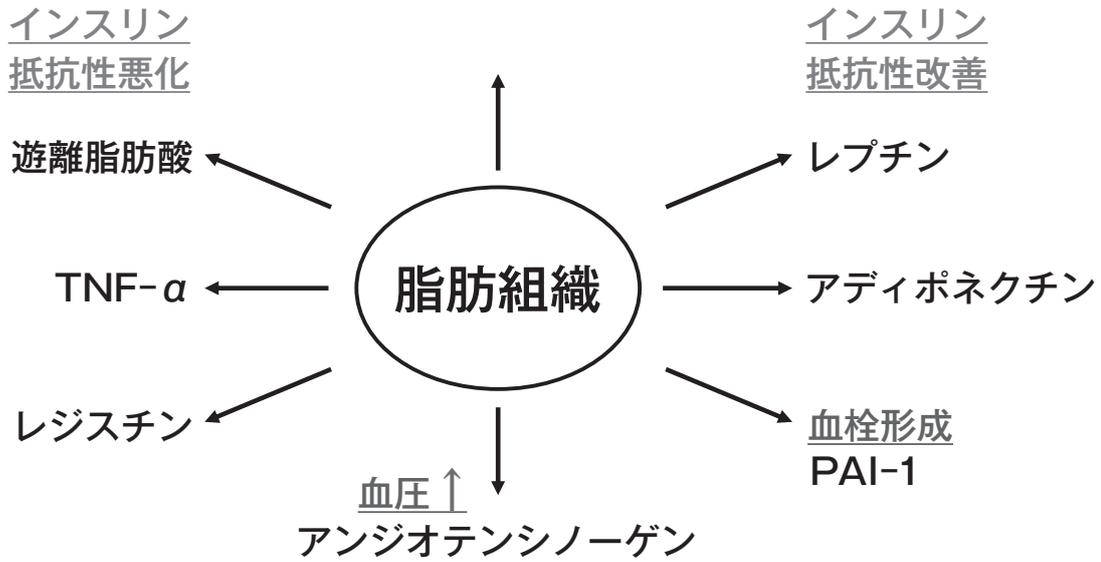


図1 脂肪組織から分泌されるアディポカインの重要性

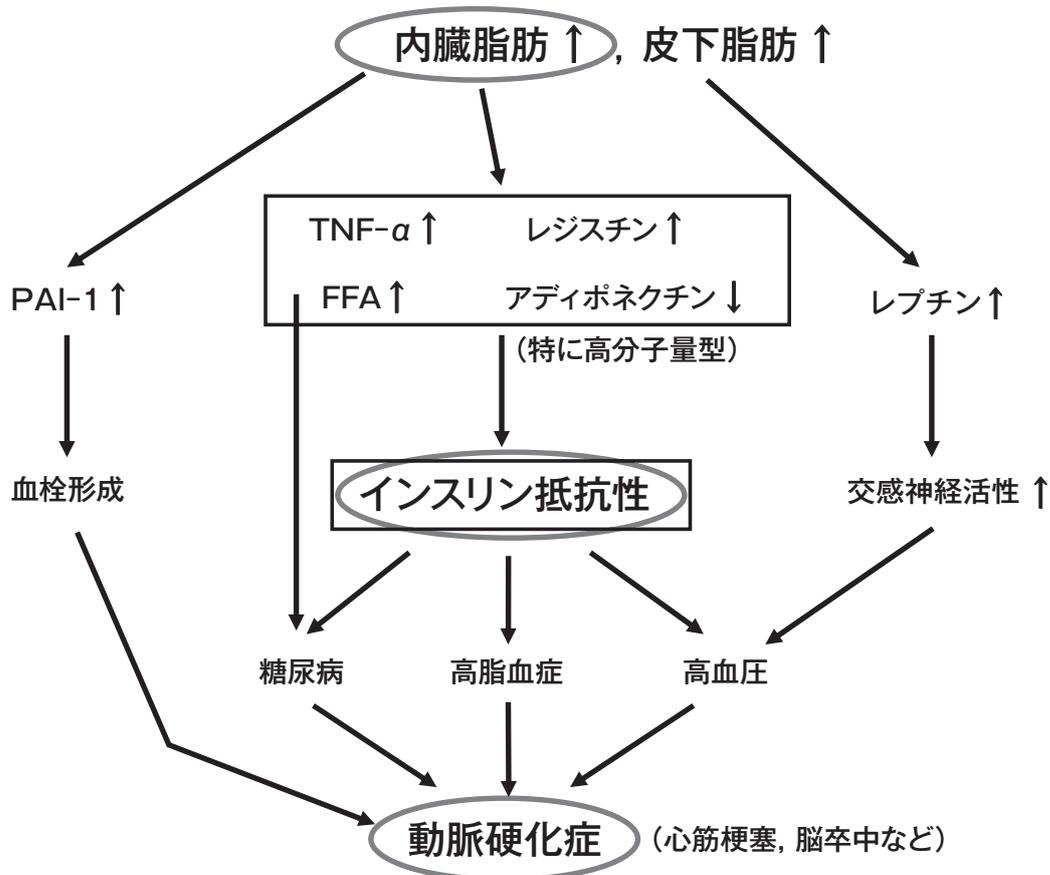


図2 肥満から動脈硬化症への介在因子

において、インスリン感受性（効きやすさ）と血中アディポネクチン濃度とは有意な正相関を示すことが示された。最近のゲルろ過法などによる解析により、ADPN は単量体（モノマー）や 3 量体（トリマー）でなく 12 量体や 18 量体などの高分子量（HMW）型のものが、冠動脈疾患の発症抑制や減量の効果⁹⁾、およびインスリン抵抗性改善薬の効果¹⁰⁾などに、より密接に関連していることが報告された。さらに、AMP キナーゼの活性化や血管内皮細胞の抗アポトーシス作用⁹⁾、および細胞増殖抑制作用は、HMW 型が主に有し、アディポネクチンの活性型は HMW 型であるとの報告が相次いだ。

我々も ELISA 法で測定したヒト血清 HMW-ADPN 濃度の意義を報告し、昨年総説を発表した³⁾。その内容の一部でもあるが、高分子量アディポネクチン濃度の方が全量アディポネクチンよりもインスリン抵抗性指数 HOMA-IR やメタボリックシンドロームとの関連がより強いことが認められ報告した¹¹⁾。

最近、HMW-ADPN 濃度の測定法として、より分析精度が向上し安価な化学発光酵素免疫測定（CLEIA）法が開発され、その有用性が期待されている。今回我々は、定期健康診断において血清 HMW-ADPN 濃度を CLEIA 法で測定し、肥満度や各種健康診断項目との関連や耐糖能別に見た血中濃度の違いの有無などを検討した。

対象と方法

2010 年度に当施設の定期健康診断を受診し、本研究に関してインフォームドコンセントの得られた 40~65 歳の男性 539 人および女性 554 人を対象とした。糖尿病の治療薬を使用中の者は除外して解析した。

正常血糖（NGT）、空腹時血糖（FPG）100-109mg/dL の IGT1、FPG 110-125mg/dL の IGT2、糖尿病（DM）の 4 群に分類した。

血清 HMW-ADPN は、富士レビオ社の

CLEIA 法試薬「高分子量アディポネクチン測定試薬」、および測定装置は「ルミパルス Prest II」（富士レビオ社）を用いて測定した。

統計解析には StatView 5.0-J を用いて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

血清 HMW-ADPN や中性脂肪（TG）、 γ GTP は対数変換後正規分布に近づいたので、相関係数や回帰分析にはその対数を用いた。

成績

1. CLEIA 法で測定した血清 HMW-ADPN の中央値は、女性で $4.85 \mu\text{g/mL}$ 、男性で $2.6 \mu\text{g/mL}$ であった。
2. 同時測定の変動係数は 1.38-2.67%、日差変動も 2.40-2.69% とかなり良好であった。検量物質値付けの見直しにより測定値は従来の ELISA 法の約 2 分の 1 であったが、ELISA 法との相関係数は 0.993 ($n=185$) と非常に良好であった。
3. \log [HMW-ADPN] と各種代謝指標との相関は、男女とも HDL-C と強い正の相関が（各々 $r=0.355$, $r=0.460$ ）、BMI、腹囲、 \log [TG] と強い負の相関が認められた（男性で $r=-0.390$, -0.360 , -0.384 、女性で $r=-0.373$, -0.329 , -0.358 、いずれも $P < 0.0001$ ）（表 1、表 2）。HbA1c と \log [HMW-ADPN] との相関係数は、男性で -0.128 、女性で -0.218 とやや弱かったが、特に女性においては年齢および BMI で補正後も有意であった（ $r'=0.215$, $P < 0.0001$ ）。
4. ステップワイズ多重回帰分析で HMW-ADPN は、HDL-C、性別、BMI、および ALT と除外 F 値 30 以上の強い関連が認められた（ $P < 0.0001$ ）（表 3）。
5. 男女とも NGT、IGT1、IGT2、DM の順に HMW-ADPN は低下したが、BMI および腹囲もその順に高くなり（表 4）、BMI または腹囲で補正後は HMW-ADPN の群間の有意差は消失した。

表1 健康診断受診男性539人における高分子量 (HMW) アディポネクチン濃度 ($2.90 \pm 1.71 \mu\text{g/ml}$) と各種因子との関係

vs. HMWアディポネクチン	平均 ± SD	<i>r</i>	<i>P</i>	年齢および BMI にて補正後	
				<i>r</i>	<i>P</i>
年齢 (歳)	49.1 ± 6.7	0.115	0.0074	—	—
BMI (kg/m^2)	23.7 ± 2.9	-0.390	<0.0001	—	—
腹囲 (cm)	84.8 ± 8.3	-0.360	<0.0001	-0.127	NS
収縮期血圧 (mmHg)	131 ± 19	-0.191	<0.0001	-0.123	0.0039
拡張期血圧 (mmHg)	81 ± 12	-0.152	0.0004	-0.086	0.0455
血糖 (mg/dl)	103 ± 13	-0.107	0.0127	-0.091	0.0265
HbA _{1c} (%)	5.2 ± 0.4	-0.128	0.0030	-0.083	0.0440
中性脂肪 (mg/dl)	135 ± 117	-0.384	<0.0001	-0.269	<0.0001
HDL-コレステロール (mg/dl)	57 ± 15	0.355	<0.0001	0.234	<0.0001
LDL-コレステロール (mg/dl)	120 ± 29	-0.126	0.0035	-0.052	NS
AST (IU/l)	24 ± 11	-0.215	<0.0001	-0.177	<0.0001
ALT (IU/l)	27 ± 17	-0.325	<0.0001	-0.214	<0.0001
γ GTP (IU/l)	51 ± 49	-0.214	<0.0001	-0.136	0.0010
尿酸 (mg/dl)	6.2 ± 1.3	-0.234	<0.0001	-0.135	0.0010
クレアチニン (mg/dl)	0.85 ± 0.12	-0.117	0.0063	-0.095	0.0167
BNP (pg/ml)	11 ± 12	0.155	0.0003	0.102	0.0118
PSA (ng/ml)	1.0 ± 0.8	-0.075	NS	-0.101	NS
白血球 ($10^3/\mu\text{l}$)	5.9 ± 1.5	-0.194	<0.0001	-0.107	0.0090
赤血球 ($10^6/\mu\text{l}$)	4.92 ± 0.37	-0.180	<0.0001	-0.069	NS
ヘモグロビン (g/dl)	14.9 ± 1.0	-0.173	<0.0001	-0.079	NS

BMI: 体格指数, *r*: 相関係数, NS: $P \geq 0.05$

表2 健康診断受診女性554人における高分子量 (HMW) アディポネクチン濃度 ($5.36 \pm 2.73 \mu\text{g/ml}$)

vs. HMWアディポネクチン	平均 ± SD	<i>r</i>	<i>P</i>	年齢および BMI にて補正後	
				<i>r</i>	<i>P</i>
年齢 (歳)	49.5 ± 6.9	0.075	NS	—	—
BMI (kg/m^2)	21.6 ± 3.1	-0.373	<0.0001	—	—
腹囲 (cm)	79.0 ± 8.8	-0.329	<0.0001	-0.071	NS
収縮期血圧 (mmHg)	122 ± 20	-0.112	0.0081	-0.017	NS
拡張期血圧 (mmHg)	74 ± 13	-0.078	NS	-0.002	NS
血糖 (mg/dl)	98 ± 10	-0.132	0.0019	-0.083	0.0470
HbA _{1c} (%)	5.2 ± 0.3	-0.218	<0.0001	-0.215	<0.0001
中性脂肪 (mg/dl)	87 ± 47	-0.358	<0.0001	-0.282	<0.0001
HDL-コレステロール (mg/dl)	69 ± 15	0.460	<0.0001	0.361	<0.0001
LDL-コレステロール (mg/dl)	118 ± 32	-0.214	<0.0001	-0.168	0.0001
AST (IU/l)	20 ± 6	-0.007	NS	-0.003	NS
ALT (IU/l)	17 ± 8	-0.215	<0.0001	-0.130	0.0018
γ GTP (IU/l)	25 ± 22	-0.149	0.0004	-0.085	0.0351
尿酸 (mg/dl)	4.4 ± 1.0	-0.156	0.0002	-0.080	NS
クレアチニン (mg/dl)	0.63 ± 0.09	0.071	NS	0.073	NS
BNP (pg/ml)	17 ± 14	0.094	0.0273	0.051	NS
白血球 ($10^3/\mu\text{l}$)	5.7 ± 1.5	-0.270	<0.0001	-0.187	<0.0001
赤血球 ($10^6/\mu\text{l}$)	4.47 ± 0.36	-0.240	<0.0001	-0.154	0.0002
ヘモグロビン (g/dl)	13.1 ± 1.2	-0.174	<0.0001	-0.136	0.0007

BMI: 体格指数, *r*: 相関係数, NS: $P \geq 0.05$

表 3 男女計1,093人における, 血清高分子量アディポネクチン濃度 (CLEIA法) の対数を従属変数としたステップワイズ多重回帰分析 (除外F値: 30) の結果

独立変数	標準回帰係数	除外F値	P	R ² の変化
HDL-コレステロール	0.274	100.9	<0.0001	26.3%
性別	0.262	100.8	<0.0001	9.7%
BMI	-0.198	52.0	<0.0001	4.3%
ALT	-0.154	35.7	<0.0001	1.8%

上記項目以外に, 年齢, 収縮期血圧, HbA1c, log [TG], 白血球を独立変数として解析に入れた。 $R^2 = (0.651)^2 = 0.421$

表 4 男女別の, 正常血糖 (NGT), 空腹時血糖 (FPG) 100-109mg/dL の IGT1, FPG 110-125mg/dL の IGT2, 糖尿病 (DM) 別による, 高分子量アディポネクチン (HMW-ADPN) 濃度や体格指数 (BMI), 腹囲の違い

男性	NGT	IGT1	IGT2	DM	P 値
N	224	184	114	16	
HMW-ADPN ($\mu\text{g/ml}$)	3.2 \pm 1.9	2.9 \pm 1.6	2.4 \pm 1.3 *	2.5 \pm 1.5	0.0004
BMI (kg/m^2)	23.1 \pm 2.9	23.7 \pm 2.8	24.6 \pm 3.0 *	24.7 \pm 2.7	<0.0001
腹囲 (cm)	83.1 \pm 8.3	84.8 \pm 8.1	87.7 \pm 7.7 *	86.5 \pm 8.1	<0.0001
女性	NGT	IGT1	IGT2	DM	P 値
N	334	133	73	12	
HMW-ADPN ($\mu\text{g/ml}$)	5.5 \pm 2.7	5.3 \pm 2.6	5.1 \pm 3.2	2.9 \pm 2.1 *	0.0107
BMI (kg/m^2)	21.0 \pm 2.7	22.1 \pm 3.4 *	22.6 \pm 3.6 *	25.6 \pm 4.0 *	<0.0001
腹囲 (cm)	77.4 \pm 7.9	80.3 \pm 9.7 *	82.6 \pm 8.8 *	88.3 \pm 11 *	<0.0001

最右列の P 値は ANOVA による。* $P < 0.0083$ vs NGT (Bonferroni/Dunn 検定)

考 察

現代の疾病構造をわが国の死亡率 (年間 114.2 万人) から考えると, 第 1 位はがん (悪性新生物, 34.4 万人) であるが, 第 2 位の心疾患 (18.2 万人) と第 3 位の脳血管疾患 (12.2 万人) を合わせた「心血管病」としてみると, 第 1 位のがんに近いレベルとなる (2009 年人口動態統計, 概数)。また, 2007 年の糖尿病実態調査によると, HbA1c (JDS 値) 6.1% 以上で糖尿病が強く疑われる人は 890 万人, HbA1c 5.6% 以上 6.1% 未満で糖尿病の可能性を否定できない人 (予備軍) は 1,320 万人と推計された。糖尿病と糖尿病予備軍を合計すると 2,210 万人

であり, これは 50~70 歳代日本人の約 30% に相当する。この糖尿病実態調査は 5 年に一度行われているが, 前回 2002 年の調査と比較すると糖尿病は 150 万人増加し, 予備軍は 440 万人も増加したことになる。糖尿病患者では虚血性心疾患の発症率が非糖尿病患者の 2 倍から 4 倍高いことが知られており, 糖尿病患者の増加と相まって, 心血管病の患者が今後ますます増えることが危惧されている。

アディポネクチンは, 脂肪細胞で最も発現が多い蛋白質として 1996 年に大阪大学で発見されたが¹²⁾, それとは独立して同年昭和大学薬学部でヒトの血清から抽出された分子量約 28,000 のゼラチン結合蛋白 (GBP28) と同一物質で

あった¹³⁾。アディポネクチンは、血管内皮細胞において炎症を惹起するシグナルを抑制したり、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することが示された¹⁾。また、動物実験において、障害を受けた血管壁に接着することが報告された。Yamauchi ら¹⁴⁾ と Berg ら¹⁵⁾ はそれぞれ、種々の肥満・糖尿病マウスを用いて、アディポネクチンを投与するとインスリン抵抗性および血糖値が改善することを報告した。また、糖尿病をきたすアカゲザルにおいて、インスリン抵抗性の進行に伴って血中アディポネクチン濃度が低下することが報告された¹⁶⁾。さらに、アディポネクチンを産生できないノックアウトマウスが遺伝子工学の技術で作製され^{17), 18)}、高脂肪食によりインスリン抵抗性や動脈硬化をきたしやすいことが示された。最近の動物実験では、アディポネクチンによる肝線維化の抑制やがんの発育抑制¹⁹⁾、および寿命延長効果²⁰⁾も報告されている。

CLEIA 法で測定した今回の検討で、HMW-ADPN はステップワイズ多重回帰分析にて HDL コレステロール、性別、および BMI と強い関連が認められた。これは以前我々が報告した内容³⁾ と合致する。しかし、今回の検討ではインスリン濃度はまだ測定していないため、インスリン抵抗性指数 HOMA-IR は算出できていない。その代わり今回の検討では、中性脂肪よりも ALT が 4 番目の因子として採択された。ALT は脂肪肝で上昇し、メタボリックシンドロームとの関連も強いいため、今回有意な独立変数として検出されたものと考えられる。中性脂肪は単相関で ALT よりも強い負の相関が認められたが、ステップワイズ多重回帰分析には HDL コレステロールも入っていて先に採択されたため、HDL コレステロールと関連の強い中性脂肪との関連は弱まったものと考えられる。

健康診断受診者における今回の検討において、CLEIA 法で測定した血清 HMW アディポネクチン濃度は男女とも NGT, IGT, DM の順に低下したが、主に肥満やインスリン抵抗性を介していることが示唆された。今後、インスリン抵抗性指数 HOMA-IR や血管の炎症マーカーである高感度 CRP、メタボリックシンドロームの有無などとの関連を検討し、心血管病の一次予防、二次予防などに活用していきたい。

総 括

1. 本研究では、化学発光酵素免疫測定 (CLEIA) 法で測定した高分子量アディポネクチン (HMW-ADPN) 濃度に関して、各種健康診断項目との関連や耐糖能別の違いの有無を検討した。
2. 当施設における定期健康診断を受診し、本研究に関してインフォームドコンセントの得られた 40~65 歳の男性 539 人、女性 554 人を対象とした。正常血糖 (NGT)、空腹時血糖 (FPG) 100-109mg/dL の IGT1、FPG 110-125mg/dL の IGT2、糖尿病 (DM) の 4 群に分類した。抗糖尿病薬使用中の者は除外した。
3. その結果、HMW-ADPN の中央値は女性で $4.85 \mu\text{g/mL}$ 、男性で $2.6 \mu\text{g/mL}$ であった。同時測定、日差変動とも 2.7% 以下で、従来の ELISA 法との相関係数は 0.993 (n=185) と非常に良好であった。
4. 男女とも HMW-ADPN は血清 HDL-C と強い正の相関が、BMI、腹囲、TG などと強い負の相関が認められた。HbA1c との相関係数は、男性で $r=-0.128$ 、女性で $r=-0.218$ であった。
5. 男女とも NGT, IGT1, IGT2, DM の順に HMW-ADPN は低下したが、BMI で補正後は群間の有意差は消失したため、肥満やインスリン抵抗性を介していることが示唆された。

6. 今後, インスリン抵抗性指数 HOMA-IR や血管の炎症マーカー, メタボリックシンドロームの有無などとの関連を検討し, 心血管病の一次予防, 二次予防などに活用していきたい。

謝 辞

本研究の一部は, 平成22年度ナテグリニド記念豊島教育研究資金による研究助成を受けた。また本論文の内容は, 第54回日本糖尿病学会(平成23年5月19~21日, 札幌)において発表した。

文 献

- 1) Matsuzawa Y, et al: Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines · adipocyte-derived bioactive substances. *Ann NY Acad Sci* 892: 146-154, 1999
- 2) 広瀬 寛, 齊藤郁夫: 高分子量型アディポネクチン測定 of 臨床的意義. *ホルモンと臨床* 57: 169-175, 2009
- 3) Hirose H, et al: Review: Serum high-molecular weight adiponectin, as a useful marker for the evaluation and care of subjects with metabolic syndrome and related disorders. *J Atheroscler Thromb* 17: 1201-1211, 2010
- 4) Nakamura T, et al: Magnitude of sustained multiple risk factors for ischemic heart disease in Japanese employees: a case-control study. *Jpn Circ J* 65: 11-17, 2001
- 5) Matsuzawa Y: Metabolic syndrome: definition and diagnostic criteria in Japan. *J Jpn Soc Int Med* 94: 188-203, 2005
- 6) Zimmet P, et al: The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12: 295-300, 2005
- 7) Arita Y, et al: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79-83, 1999
- 8) Hotta K, et al: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1595-1599, 2000
- 9) Kobayashi H, et al: Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 94: e27-31, 2004
- 10) Pajvani UB, et al: Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-12162, 2004
- 11) Seino Y, et al: High molecular weight multimer form of adiponectin as a useful marker to evaluate insulin resistance and metabolic syndrome in Japanese men. *Metabolism* 56: 1493-1499, 2007
- 12) Maeda K, et al: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221: 286-289, 1996
- 13) Nakano Y, et al: Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120: 803-812, 1996
- 14) Yamauchi T, et al: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946, 2001
- 15) Berg AH, et al: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953, 2001
- 16) Hotta K, et al: Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50: 1126-1133, 2001
- 17) Kubota N, et al: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277: 25863-25866, 2002
- 18) Maeda N, et al: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8: 731-737, 2002
- 19) Bråkenhielm E, et al: Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2476-2481, 2004
- 20) Otabe S, et al: Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E210-218, 2007