

学位論文題名

Application of dynamic light scattering to  
LDL measurement -Attempt for quantitative  
evaluation of small, dense LDL-

(動的光散乱によるコレステロール粒子の計測  
-sdLDL 粒子の定量評価をめざして-)

学位論文内容の要旨

Recently, the strong correlation between the amount of the small, dense low density lipoprotein (sdLDL) and coronary diseases is widely acknowledged. Therefore, the quantitative evaluation of the fraction of sdLDL in total LDL has become clinically important. However, conventional methods for the evaluation of lipoprotein amounts are complicated, time-consuming, laborious, and difficult to apply to many samples. To answer this demand and to overcome problems of present techniques, a technique was developed to measure the fraction of sdLDL using dynamic light scattering (DLS) principle. This technique is simple and does not requires long measurement time. Thus it is useful in clinical practices.

The fraction of the sdLDL can be calculated if the size distribution of LDL can be estimated by the DLS. However, it has been known that the size distribution obtained by DLS is neither stable nor repeatable if the distribution is wide or multi-modal. To solve this problem, a technique was newly developed to obtain the fraction of sdLDL without estimating the unreliable size distribution in DLS. With this technique, the fraction is calculated directly from the intensity fluctuation of scattered light obtained in the DLS measurement.

Three mathematical solutions for sdLDL fraction were derived in closed forms based on different assumptions. Method #1 gives the solution for the fraction estimation when the particle size distribution is assumed as a linear sum of the Dirac's delta functions. This method requires the mean sizes of small and large scatterers the fraction of which is of interest. Method #2 gives the solution for the fraction when the size distribution is assumed as a linear sum of Gaussian functions. This method requires both mean sizes and standard deviations of the small and large scatterers. Method #3 gives the solution for the fraction when the size distribution is assumed as a linear sum of rectangular functions. This method requires the size ranges of the small and large scatterers. In practical applications with LDL,

the information of the LDL subclasses is often given in the condition of the method #3.

The existence of undesired larger particles in scatterers causes serious errors in the scattering measurement. To suppress this effect, the autocorrelation function of the scattered light intensity fluctuation was processed before applying the mathematical solutions. The autocorrelation function was curve-fitted with a two-exponentials model and the component of distinct large scatterers was eliminated. The effectiveness of this pre-processing was confirmed in the experiment using the latex standard particles with the diameters similar to LDL.

First, the effectiveness of the proposed techniques was examined using the solutions of known fractions. Test solutions were prepared by mixing the solutions of the latex standard particles with two different sizes, 21 nm and 28 nm. The fractions estimated by all the three methods (#1~#3) agreed well with the given fractions.

Then the applicability of the proposed techniques to the estimation of the sdLDL fraction was tested. The sdLDL and the large LDL (lLDL) were separated from the human serum by sequential ultracentrifugation, and the test samples with known fractions were prepared. The sdLDL fractions were estimated by the methods #1, #2, and #3. Satisfactory correlation between the given and the estimated fractions were obtained with the methods #1, #2, and #3. The estimated fractions were always smaller than the given fractions. This seemed to be the stronger effect of larger particles on the scattered intensity than the smaller particle. However, this discrepancy can be compensated by calibrating the estimated values by a predetermined factor since the correlation is high and stable. In practice, the sdLDL and lLDL are commonly characterized by their size ranges. Therefore, it was found that the method #3 is suitable for the estimation of sdLDL fraction.

In summary, a new technique was developed to quantify the clinically significant sdLDL in the total LDL. This technique is based on the principle of the dynamic light scattering. However, it does not require the process of the unreliable size distribution estimation which has been required in conventional techniques. The feasibility and the usefulness of the proposed techniques were verified in the experiments with the sdLDL in the human serum. This technique makes point-of-care testing of the sdLDL possible, which has been awaited long in clinical practice.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 孝 一

副 査 教 授 河 原 剛 一

副 査 教 授 千 葉 仁 志 (保健科学研究院)

学 位 論 文 題 名

## Application of dynamic light scattering to LDL measurement -Attempt for quantitative evaluation of small, dense LDL-

(動的光散乱によるコレステロール粒子の計測  
-sdLDL 粒子の定量評価をめざして-)

LDL(low density lipoprotein)の中でも、小型で比重の大きい sdLDL(small, dense LDL) は、心疾患との高い相関から、臨床検査における重要性が指摘されている。sdLDL を計測する方法として、従来は主に超遠心分離や電気泳動が用いられてきた。しかし、これらの手法は煩雑で長時間を要する。そこで、sdLDL の定量評価を簡便かつ短時間で行うことをめざし、動的光散乱 (dynamic light scattering, DLS) を応用した手法を考案した。DLS とは、溶液中でブラウン運動している粒子群からの散乱光強度のゆらぎ (時間的変動) を計測し、粒子径や粒径分布を求める方法である。この計測は比較的容易に短い時間で行えることから、簡便かつ短時間で sdLDL の定量評価の実現が期待できる。これまで、DLS を応用した LDL 計測の報告例はある。しかし、これらは DLS の一般的方法で粒径分布を得るものであり、得られる粒径分布の再現性や信頼性に問題があって、実用には至っていない。そこで、従来法の問題点であった粒径分布を経ることなく、DLS 計測で得られる自己相関関数自体から直接 sdLDL の割合を求める方法を新たに考案した。

光散乱理論に基づき、自己相関関数から sdLDL の重量比を求める三種の式を、理論的に導出した。第一の方法 (Method #1) では、二種散乱体の粒径分布をそれぞれ delta function つまり粒径がほぼ一定と仮定する。この方法では、sdLDL の平均粒径およびそれ以外の LDL (large LDL, lLDL) の平均粒径は既知とする。散乱光強度ゆらぎの自己相関関数から混合散乱体の平均粒径を推定すれば、これら三種の平均粒径を用いて sdLDL の重量比を求めることができる。第二の方法 (Method #2) では、二種散乱体の粒径分布をそれぞれガウス分布と仮定する。この方法では、sdLDL と lLDL それぞれの平均粒径と標準偏差の両方が必要になる。計測した自己相関関数とこれらのパラメータから、sdLDL の重量比が得られる。第三の方法 (Method #3) では、二種散乱体の粒径分布をそれぞれ矩形形状と仮定する。つまり、sdLDL と lLDL の粒径範囲が既知であれば、自己相関関数から、直接 sdLDL の重量比を求めることができる。

開発した手法では、sdLDL の重量比を求めるのに、従来法のように自己相関関数から粒径分布を

複雑なプロセスで推定する必要がない。ただしその精度は、従来法と同様に自己相関関数の計測精度に依存する。そこで、自己相関関数の計測精度の向上を図った。DLS 計測は、対象粒子からの散乱光強度計測を基本とする。したがって、不純物や散乱粒子の凝集など大粒子の影響を強く受ける。この問題に対処するため、計測された自己相関関数から、大粒子に対応する成分をカーブフィッティング法により除去する方法を考案した。粒径既知の標準粒子を用い、この前処理によって自己相関関数の計測精度を大きく向上できることを確かめた。

このような提案手法の有効性を確かめるため、実験的検討を行った。実験では、まず sdLDL と LDL の粒径に近い、21 nm と 28 nm のラテックス標準粒子を使用した。これらの粒子の混合比を種々変化させた試料を作成し、提案手法により 21 nm 粒子の混合比を推定した。その結果、三種の手法すべてにおいて、与えた混合比と推定された混合比は、良好な一致を示し、各手法の有効性が確認された。

次に、実際に LDL を用い、提案手法による sdLDL 重量比推定の有効性を検証した。まず、超遠心装置を使ってヒト血清から sdLDL と LDL を分離した。これらを種々の割合に混合することにより、sdLDL 重量比既知の試料を多種類作成した。これらの試料から計測された散乱光ゆらぎの自己相関関数に対し、提案三手法を適用した。その結果、三手法すべてにおいて、推定した重量比は与えた重量比に対し 95% 以上の高い相関を示した。ただし、推定した重量比は、与えた重量比より 20~30% 小さくなる傾向が見られた。しかし、この傾向は、補正曲線を用いた補正により十分対処可能であることも確認された。三種の手法を比較した場合、対象粒子の粒径範囲を必要とする第三の手法 (Method #3) が、推定精度も高いことから、最も実用的であると結論づけられた。

このように本論文では、sdLDL の定量評価をめざし、DLS の自己相関関数から直接 sdLDL の重量比を求める式を、閉じた解析解として新たに導出している。またこの式をもとに、sdLDL の重量比の推定方法を新たに開発し、その有効性を実証している。

これを要するに、筆者は光による新たな sdLDL の定量方法を考案するとともに、標準粒子および LDL を用いた実験的検討をとおり、その有効性ならびに実用可能性を実証した。これらの成果は、ナノメートルレベルの生体微粒子の重量比推定に新たな手法を提供するものであり、ひいては生体医工学のさらなる発展に貢献するところ大なるものがある。よって筆者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。