

TOSOH

SEPARATION REPORT

TSKgel Lipopropakを用いた血清中のリポタンパク質の分析

——目 次——

	ページ
1. はじめに	1
2. リポタンパク質分析システムについて	1
3. リポタンパク質の分析	2
4. 分析条件の影響について	5
5. 応用例	9
6. おわりに	9

追 補

HPLCによる総コレステロールとHDLコレステロールの同時定量法
岡崎三代、笹本恵子、村松敏夫、柳澤 勉*、亀井幸子*、保崎清人*
(東京医歯大、教養部化学、医学部保健衛生学科*)

1. はじめに

血清リポタンパク質は、コレステロール、リン脂質、中性脂肪（トリグリセリド）などの脂質とアポリタンパク質とよばれるタンパク質の複合体であり、脂質の含有量やタンパク質の種類などによっていくつかの種類があります。したがって、血液中の脂質成分を分析するうえで血中の総量を測定するだけでなくリポタンパク質として分離・定量することが重要です。

従来リポタンパク質の分析には、超遠心法が使用されていますが、高額な設備と大量の血液が必要であり、かつ測定時間が長い、という問題があります。一方、これら問題を克服すべくHPLCが分析法として使用され、1980年世界に先がけて原・岡崎らが開発した方法が^{1)~3)}、HPLC法の基準となっています^{6)~7)}。しかしHPLC法においては、リポタンパク質のカラムへの非特異的吸着の問題の解決や、さらに分析時間の短縮化が要望されていました。今回、当社ではこのような問題を解決するためにリポタンパク質専用カラムTSKgel Lipopropakと専用溶離液TSKeluent LP-1を開発し、HPLC法によるリポタンパク質の分析法を確立しました。

TSKgel LipopropakとTSKeluent LP-1を使用した血清リポタンパク質の分析では、血中のリポタンパク質成分を短時間（分析サイクル時間 10分以内）でCM (Chylomicron), VLDL・LDL (Very Low Density Lipoprotein・Low Density Lipoprotein), HDL (High Density Lipoprotein) に分離することができます。さらに、リポタンパク質を構成している脂質の中で、動脈硬化、肝疾患、糖尿病や一時的な脂質代謝異常のスクリーニング検査として最も日常的に測定されるコレステロールを、オンラインポストカラム反応によって、各リポタンパク質ごとに定量することができます。

ここでは、TSKgel LipopropakとTSKeluent LP-1を用いた東ソーリポタンパク質分析システムによる血清リポタンパク質の分析について報告します。

尚、この報告は、平成5年10月2日、日本臨床化学会での発表内容^{8)~10)}を演者らのご厚意により参考としました。

2. リポタンパク質分析システムについて

リポタンパク質分析システムは装置の立上げから測定、データ処理、レポート出力までの全自動分析、連続分析が可能な分析システムです。

2-1. 原理

血清（未処理）

↓

ゲル濾過クロマトグラフィー（分子サイズに基づいてリポタンパク質を分離）

↓

ポストカラム反応（酸素反応によるコレステロールの検出）

↓

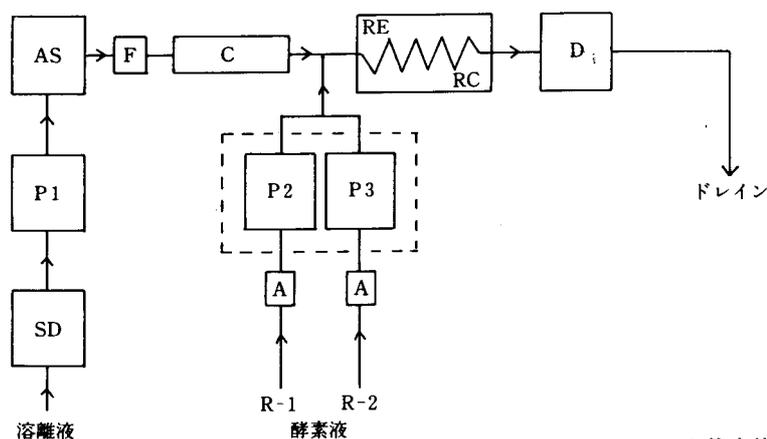
コレステロール量の算出（標準又は、管理血清の一点検量線法）

2-2. システムの基本構成

システムの基本構成図を図-1に示します。装置はすべて東ソー汎用HPLC CCP&8020シリーズが使用されています。

カラムは分析カラムとガードカラムがあります。ラインフィルタ（フィルタK）は、ガードカラムを使用する場合でも、使用してください。

また、コレステロールの検出のほかに血清タンパク質のUV吸収を検出したい場合はUV検出器をリアクタの前に組込んで分析することができます。



SD	: デガッサー	(SD-8022)
P1	: ポンプ1	(CCPS)
P2	: ポンプ2	(CCPM-II)
P3	: ポンプ3	(CCPM-II)
AS	: オートサンプラー	(AS-8020)
F	: ラインフィルタ	(フィルタK)
C	: カラム	(TSKgel Lipopropak)
RE	: リアクタ	(CO-8020で代用)
RC	: 反応コイル	(反応コイルK)
D	: 検出器	(UV-8020)
A	: エアトラップ	(エアトラップS)
	システムコントローラ	(SC-8020)

図-1 システムの基本構成図

2-3. 分析条件

①試料

血清：5 μ l

②ゲル濾過クロマトグラフィー

カラム：TSKgel Lipopropak (7.5mmI.D.×30cm)

溶離液：TSKeluent LP-1

流速：0.6ml/min

温度：室温

③ポストカラム反応

反応コイル：反応コイルK (0.4mmI.D.×7.5 m)

酵素液：デタミナーL TC(協和メデックス)

流速：0.225ml/min (酵素液R-1)

0.075ml/min (酵素液R-2)

温度：45℃

検出：VIS (550nm)

3. リポタンパク質の分析

東ソーリポタンパク質分析システムの標準分析マニュアルを以下に示します。なお、本分析システム以外の装置を使用して分析をされる場合の注意事項も併記しています。

3-1. 試料

①血清5 μ lを使用してください。(希釈等の前処理は必要ありません)

②コレステロール値が非常に高くクロマトグラムのピークトップにひずみが見られる検体については血清注入量を2-3 μ lにして再測定をしてください。

3-2. クロマトグラフィー

①新しいカラムを使用される場合は必ず溶離液に充分置換して使用してください。溶離液への置換は流速0.6ml/minで90min以上おこなってください。

②溶離液への置換が終了して測定を開始する前に、不要な血清をカラムに注入してカラムのエージングをおこなってください。エージングは血清10 μ lを数回、10-15分間隔で注入してください。

③測定前に溶離液の流速が0.6ml/minであることを確認してください。

④カラムの温度は室温が25±5℃にコントロールされている測定室であれば測定値への温度の影響は非常に小さいため特に冷却機能付カラムオープンの必要

はありませんが、室温が25±5℃をこえるよう測定室では温度の影響によって測定値が若干変化しますので、冷却機能付カラムオープンの使用をおすすめします。

⑤本カラムにはガードカラムを装着することをおすすめします。ガードカラムの使用は本カラムへの吸着物質の蓄積を防ぎ、それに起因するカラムの劣化を防ぎます。なお、ガードカラムを装着した場合分析時間は約1分長くなります。

3-3. ポストカラム反応

①反応コイルは必ず当社の専用コイル(反応コイルK)を使用してください。

②酵素液はデタミナーL TC(協和メデックス)を使用してください。

デタミナーL TCにはR-1、R-2の2種類の酵素液がありますが予め混合して使用すると劣化しやすいため、別々に送液しポンプの出口で混合できるポンプシステムの使用をおすすめします。

酵素液の流速は、R-1を0.225ml/min、R-2を0.075ml/minに設定してください。2液の送液ができないポンプを使用する場合は、酵素混合液(混合比3:1)で使用してください。ただし、混合液は1日以内に使用してください。

③コレステロール反応には酸素が必要なため酵素液は脱気しないでそのまま使用してください。ただし、ポンプにエアが混入しないようにポンプの入口側に専用のエアトラップ(エアトラップS)を取り付けてください。

④測定中は酵素液は保冷剤や氷水で冷やしながら使用してください。

⑤反応温度は45℃にして測定してください。

⑥コレステロールの検出はVIS(550nm)で行なってください。

3-4. 検量線の作成方法

①測定前にコレステロールの管理用血清を検体の測定条件で測定して濃度とピーク面積の検量線を作成してください。検量線は5 μ lの一点検量線で作成します。ただし、測定は連続して3回行ない、後の2回の平均値を使用してください。(1回目は測定値が低い場合があります)

②検量線の作成は測定開始前毎に行なってください、
また、50検体以上の連続測定をおこなう場合は、50
検体毎（約8時間毎）に管理用血清を測定して測定
値や分離パターンが変わらないことを確認してくださ
い。

③管理用血清としては凍結乾燥品よりも凍結品（溶液）
の使用をおすすめします。

3-5. 連続測定における分析時間とデータ取込時間

①ガードカラムを装着しない場合、1検体あたりの分
析時間（試料注入からピークエンドまで）は装置の
デッドボリュームによって異なりますが約17分程度
です。[図2-(1)]しかし、多数検体を測定する場合
はクロマトグラム [図2-(2)] に示すように、デー
タ取り込み時間を、例えば8.0-17.5分 [図2-(1)
START-END] にすることによって、分析サイクル
時間が9.5分の連続測定が可能です。

②データの取込時間は使用される管理用血清の測定結
果（分離パターン）から取込開始時間と取込終了時
間を設定してください。

3-6. システム制御とデータ処理

①ケーブルの接続が完了し、各機器の電源が投入され
た後、システムの立上げはスーパーシステムコント
ローラSC-8020用フロッピーディスク（システム制御
及びLC処理プログラム、#1-3）をSC-8020のド
ライブにセットしておこないます。

②リポタンパク質分析のシステム制御とデータ処理は
標準分析条件及びデータ処理がファイルされたフロ
ッピーディスク（LIPOSYS及びLIPODATA）をSC-
8020のドライブにセットしておこないます。

③①、②が終了すればシステムは運転（測定）可能な
状態になります。検体の測定開始前には3-4項で述
べたように、管理血清を測定して分析結果からコレ
ステロールの濃度と生データのピーク面積をSC-8020
の画面の検量線データに数値を入力してから検体
の測定を開始してください。以後、自動的に分析結
果が図-3のように出力されます。

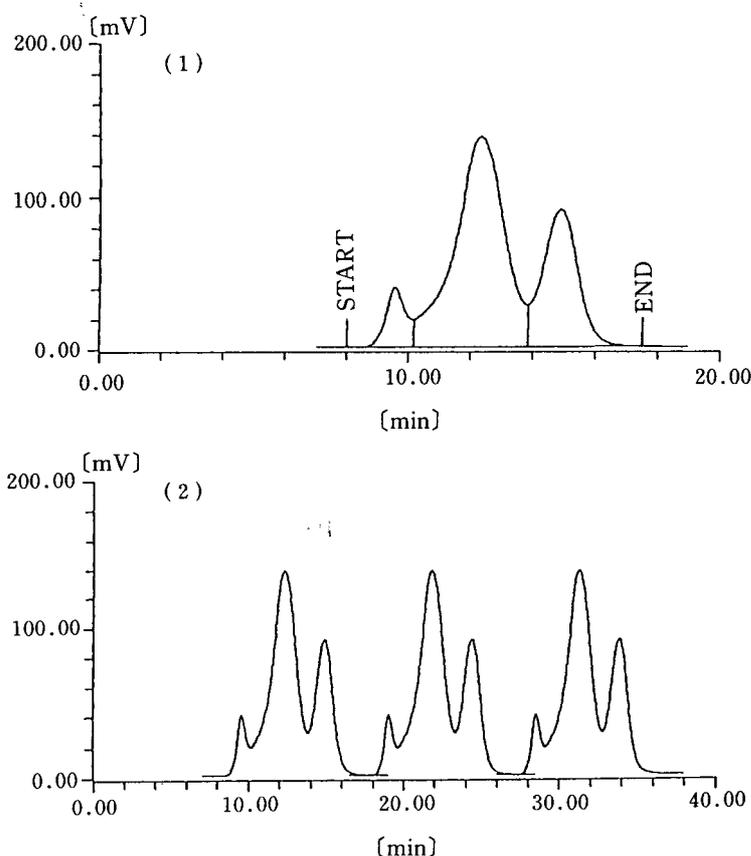
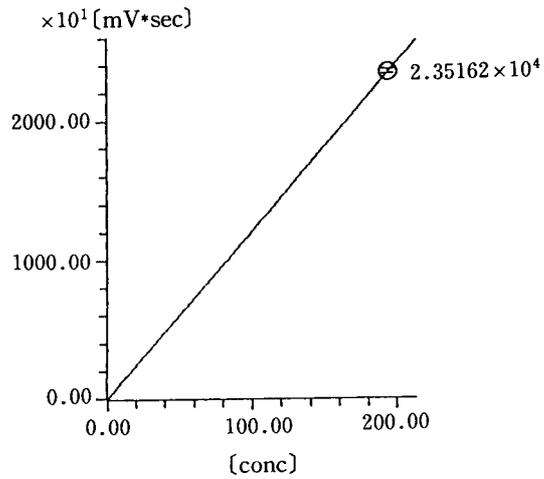
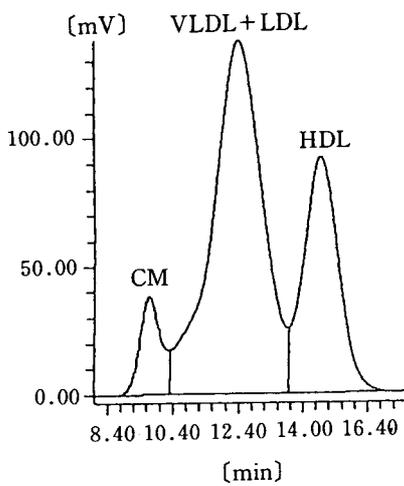


図-2 分析時間とデータ取込時間

*** リポタンパク質 分析レポート ***



Ch No.: データ収集 Ch.1
 カップ番号: 001
 シリアル番号: 0001
 保存名: AAAA0001

計算方法: 絶対検量線法
 サンプル名:
 希釈率: 1.000

*** 計算結果 ***

No.	ピーク名	保持時間 [min]	高さ [mV]	面積* [mV*sec]	コレステロール	
					[mg/dl]	[mmol/l]
1	CM	9.683	38.30	1.72777×10^3	14.239	0.370
2	VLDL+LDL	12.446	138.34	1.49163×10^4	122.928	3.196
3	HDL	14.954	92.11	7.03617×10^3	57.986	1.508
合計				2.36803×10^4	195.153	5.074

図-3 分析結果の出力例

4. 分析条件の影響について

TSKgel LipopropakとTSKeluent LP-1を用いたリポタンパク質分析での分析条件の影響について基礎的な検討を行ないました。ここではその結果について述べます。

4-1. 溶離液の流速の影響

図-4に、リポタンパク質分析への溶離液の流速の影響について検討した結果を示します。各流速での酵素の濃度(33.3%)とコレステロールの反応時間(1.05分)を一定にして、溶離液の流速を変えた時、溶離液の流速は分離能と分析時間に影響し、流速が速くなると分離能は徐々に低下します。また、分析時間は流速が早くなると短くなります。しかし、流速が0.3~0.8ml/minの範囲ではHDLのコレステロール値にはほとんど影響しませんでした。

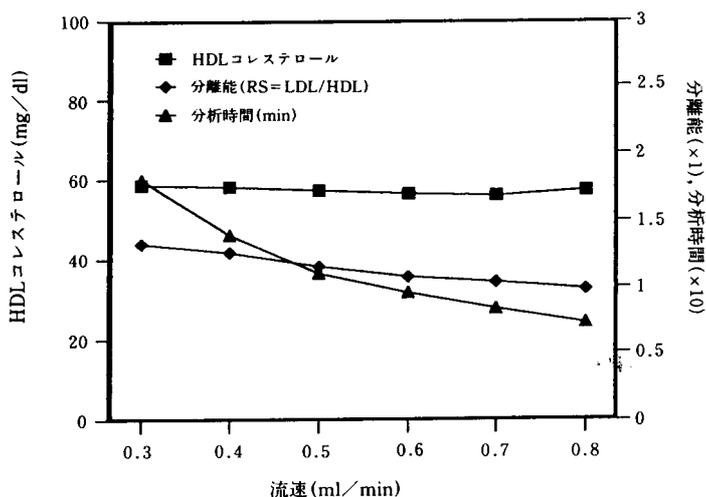


図-4 溶離液の流速の影響

4-2. 酵素液の流速の影響

図-5に、コレステロール反応(総コレステロール:T-CHO)への酵素液の流速の影響について検討した結果を示します。図は溶離液の流速を0.6ml/minに一定し、酵素液の流速を0.1~0.6ml/minまで変化させ、その時のコレステロールの反応時間が一定になるように反応コイルの長さ(容量)を変えて流速の影響を調べたところ、酵素液の流速は溶離液の流速の1/2の0.3ml/min以上で一定の反応量が得られることがわかりました。また、溶離液の流速を変えて同様に検討したところ、いずれも溶離液の1/2の流速(酵素の濃度33.3%)が最適でした。

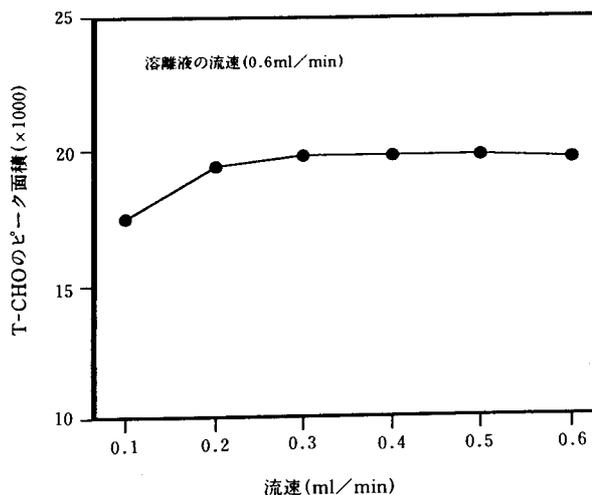


図-5 酵素液の流速の影響

4-3. ポストカラム反応における温度の影響

図-6に、カイロミクロンとVLDLの含量が多い高脂血症患者の血清を用いてポストカラム反応における反応温度の影響を検討した結果を示します。HDLやLDLなどの分子サイズの小さいものは反応温度が35°C以上で反応のエンドポイントが得られるのに対してカイロミクロンやVLDLなどの分子サイズが大きいものでは45°C以下ではエンドポイントが得られず、この反応系ではエンドポイントを得るための反応温度が分子サイズに依存することがわかりました。

以上の結果から、ポストカラム反応における最適な温度は45°Cといえます。

4-4. 分離温度の影響

図-7には、リポタンパク質分析へのカラムの分離温度の影響を検討した結果を示します。図からわかるように分離温度の変化に対して、カイロミクロンやHDLのピーク面積はほぼ一定なのに対してLDLのピーク面積が温度の上昇とともに小さくなり温度依存性が見られます。その結果、総コレステロール (T-CHO) のピークも小さくなり、相対的にHDLコレステロールの値が大きくなります。また、その時の温度依存性は分離温度が30°C以上から顕著になります、したがって、測定室の温度が30°Cをこえるような場合には正確な測定をするために冷却機能付カラムオーブンをしてできるだけ使用してください。

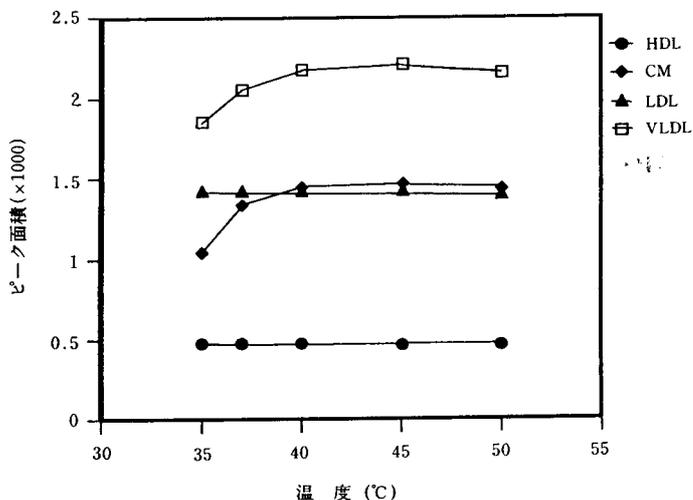


図-6 ポストカラム反応における温度の影響

4-5. 分析条件と酵素の消費量

表-1は、以上の検討結果に基づいて反応温度45°Cで、各流速での十分な反応時間を得るための必要な反応コイルの長さ、1検体あたりの分析時間及び、酵素の消費量をまとめたものです。十分な反応時間を得るためには、反応コイルの長さは流速に比例して長くなりますが、分析時間は短くなります。しかし、4-1で示したようにHDLの測定値はほとんど変わりません。さらに、1検体当りの酵素の消費量はいずれの分析条件でも2.7-2.9mlとほぼ同じになります。

したがって、多数の検体を測定する場合は流速を速くして分析時間を短くするほうが検体処理の点で有利です。

表-1 分析条件と1検体当りの分析時間及び酵素液の消費量

流速 (ml/min)		チューブ長さ (m)	1検体当りの	
溶離液	酵素液		分析時間(分)	酵素液の消費量(ml)
0.3	0.15	5.0	18.0	2.7
0.4	0.20	5.0	14.0	2.8
0.5	0.25	7.5	11.0	2.8
0.6	0.30	7.5	9.5	2.9
0.7	0.35	10.0	8.4	2.9
0.8	0.40	10.0	7.3	2.9

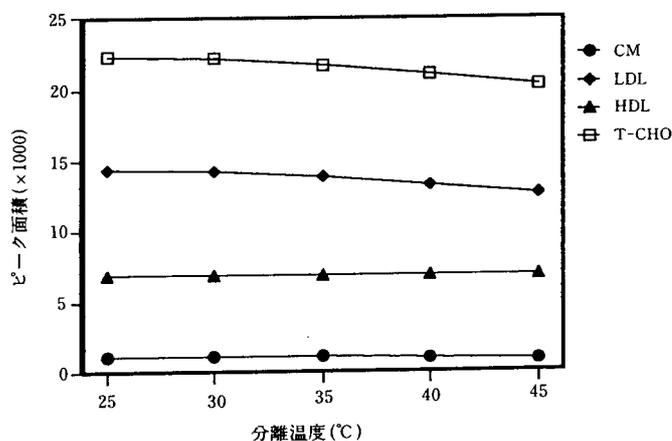


図-7 分離温度の影響

4-6. カラムの耐久性

図-8は、カラムの耐久性について調べた結果を示します。血清5 μ lを1650回まで連続注入し、150回目毎にHDLコレステロール値と分離能を調べたところ、いずれも変化が見られませんでした。したがって、少なくとも1500検体以上の測定が可能なカラムと言えます。ちなみに、このデータはガードカラムを装着しない時の結果でありガードカラムを装着すればさらに耐久性は向上すると思われます。

4-7. 測定の再現性

表-2は、測定の再現性について調べた結果を示します。同時再現性については分析時間7.3分及び9.5分ともにC.V.値1%以下、また日差再現性についても分析時間9.5分でC.V.値1.5%以下の良好な結果が得られ、再現性のよい分析法であると言えます。

4-8. 従来法との相関性

従来法とHPLC法の相関性について検討した結果、きわめて良好な相関が得られました。詳細は、文末の追補「HPLCによる総コレステロールとHDLコレステロールの同時定量法」を参照下さい。

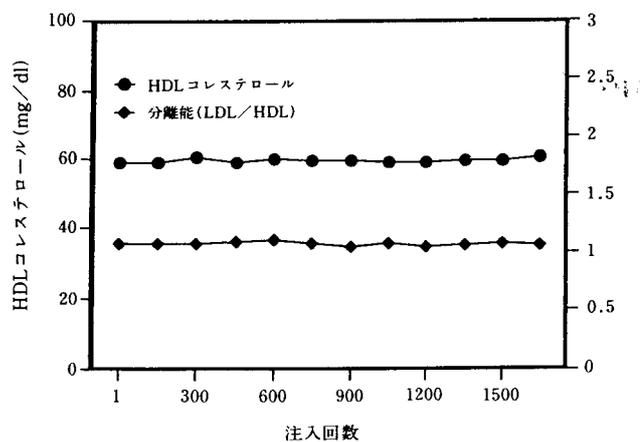


図-8 カラムの耐久性

表-2 測定の再現性

同時再現性 (HDL コレステロール)

分析時間 (min)	Mean \pm SD (mg/dl)	CV (%)
7.3	59.65 \pm 0.58	0.97
9.5	59.01 \pm 0.23	0.39

試料：標準血清 (化検協) N=10

日差再現性 (HDL コレステロール)

分析時間 (min)	Mean \pm SD (mg/dl)	CV (%)
9.5	59.01 \pm 0.82	1.40

試料：管理血清 (化学品検査協会の標準血清)

4-9. 分離へのガードカラムの影響

図-9は、ガードカラムを装着した場合の分離への影響を調べた結果を示します。図-9-(1)のクロマトグラムはガードカラムを装着した場合の分析時間の遅れを示しています。(実線のクロマトグラムはガードカラムなし、破線のクロマトグラムはガードカラムあり)約1分程度分析時間が長くなるのがわかります。図9-(2)は2つのクロマトグラムを重ね書きして分離を比較したのですがクロマトグラムからわかるようにガードカラムを装着した場合、わずかに良い分離が得られます。しかし、HDLコレステロールの値にはほとんど影響しませんでした。

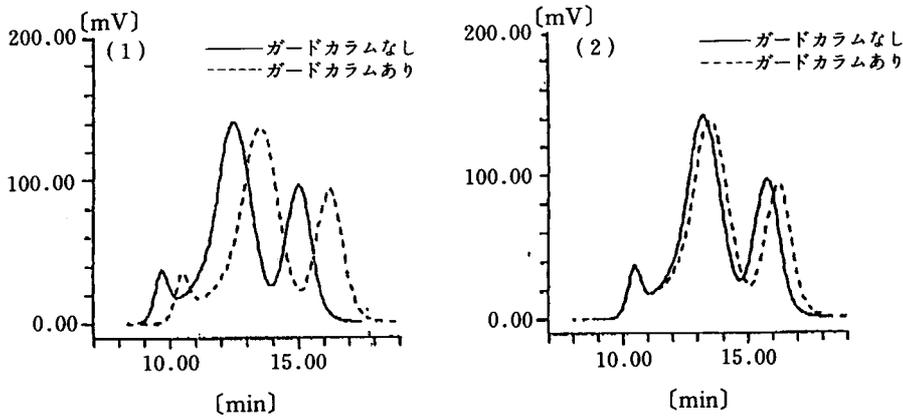


図-9 ガードカラムの影響

5. 応用例

図-10に、カラム1本及び2本連続した場合の分離の比較、図-11、図-12にマウス眼窩採血血漿(5 μ l)の分析例を示します。

6. おわりに

以上、TSKgel LipopropakとTSKeluent LP-1を使用した血清リポタンパク質の分析について述べました。本分析法は総コレステロールとHDLコレステロールの同時定量が可能であり、操作の複雑な沈澱法よりも有用と思われます。また、分析時間も従来のHPLC法より短縮(1検体10分以内)され多数検体の連続分析にも有用です。

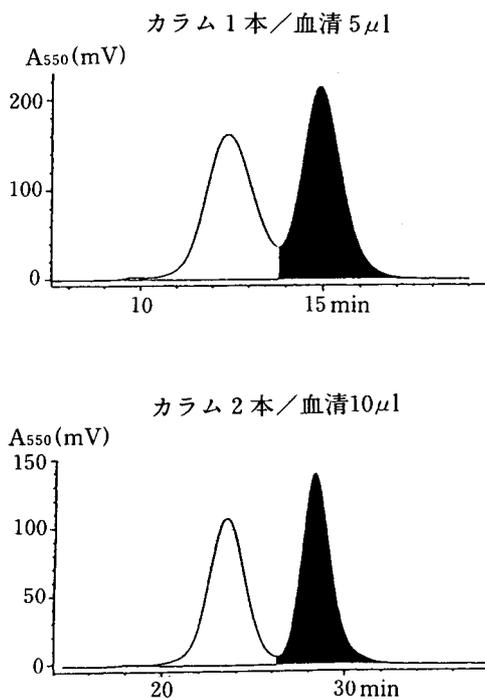


図-10

[文献]

- 1) M. Okazaki, Y. Ohno and I. Hara, J. Chromatogr., **221**, 257, 1980
- 2) M. Okazaki, K. Shiraishi, Y. Ohno and I. Hara, J. Chromatogr., **223**, 285, 1981
- 3) M. Okazaki, H. Hara, A. Tanaka, T. Kodama and S. Yokoyama, N. Engl. J. Med., **304**, 1608, 1981
- 4) I. Hara, K. Shiraishi and M. Okazaki, J. Chromatogr., **239**, 549, 1982
- 5) M. Okazaki, H. Itakura, K. Shiraishi and I. Hara, Clin. Chem., **29**, 768, 1983
- 6) I. Hara and M. Okazaki, Methods in Enzymology, Vol. 129, Orlando, Florida: Academic Press, 1986, 549-557
- 7) M. Okazaki, T. Muramatsu, K. Makino & I. Hara; in CRC Handbook of Chromatography: Lipids III, pp 101 (1993).
- 8) 北村・加藤・岡崎・村松; 臨床化学, Vol. 22 Supp 2, 36 b (1993)
- 9) 岡崎・村松・柳澤・亀井; 臨床化学, Vol. 22 Supp 2, 37 b (1993)
- 10) 岡崎・村松・柳澤・亀井・保崎; 第32回油化学討論会・研究発表会[大阪、1993年11月]

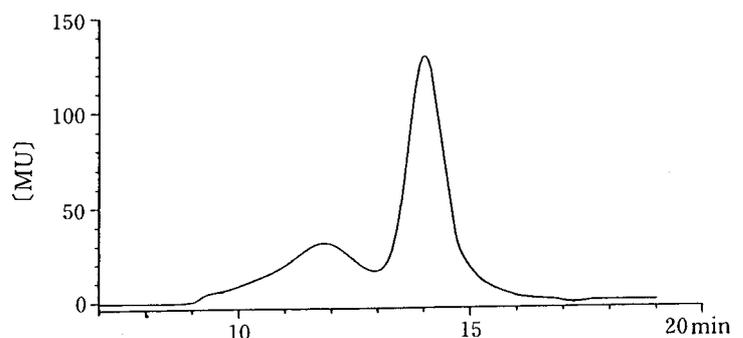


図-11 正常マウスの眼窩採血血漿(5 μ l)の分析

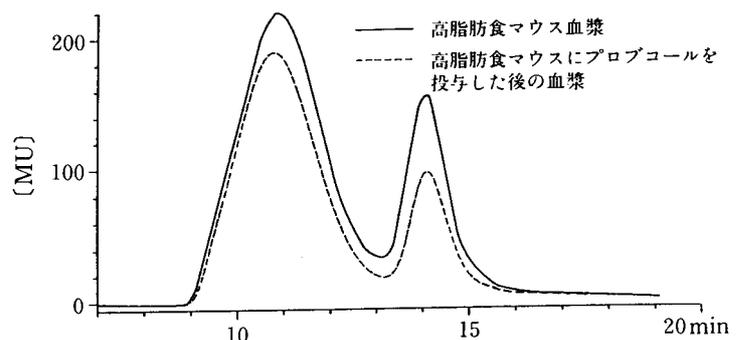


図-12 高脂肪食マウスの眼窩採血血漿(5 μ l)の分析

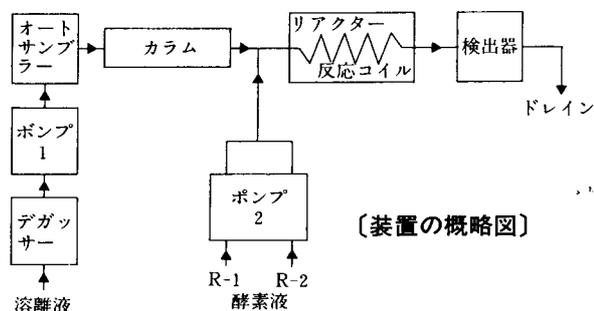
HPLCによる総コレステロールとHDLコレステロールの同時定量法

○岡崎三代・笹本恵子・村松敏夫・柳澤勉*・亀井幸子*・保崎清人*

(東医歯大教養部化学・医学部保健衛生学科*)

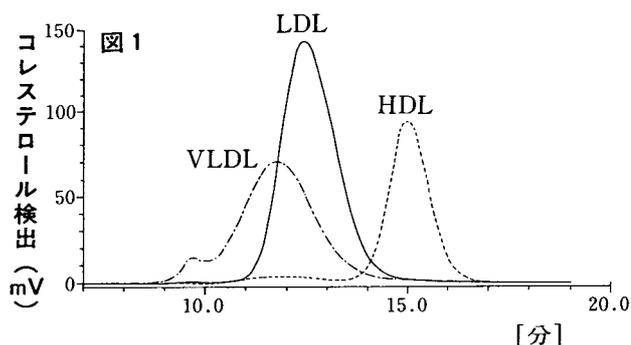
〔目的〕1980年、ゲルクロマトグラフィーによるリポ蛋白の分離に TSK-GEL カラム(東ソー)を用いた HPLC が導入された。コレステロールの酵素反応によるオンライン検出と組み合わせた HPLC 法は多数検体の簡便な分析法として評価されてきたが臨床検査法として実用化されるにいたっていない。最近リポ蛋白専用のカラムと溶離液が開発されカラムへのリポ蛋白の吸着問題がほぼ解決され、1検体あたり10分以内で分析が可能となった。この新しい分析システムを用いて血清リポ蛋白のサイズによる分画・定量法を超速心法や結合沈澱法と比較検討した。

〔方法〕HPLC はリポ蛋白専用カラム (LIPOPROPAK、内径7.5mm、長さ30cm/東ソー) と専用溶離液 (TSK eluent LP-1/東ソー) を用いた新しい分析システム (CCP& 8010 シリーズ/東ソー) により行った。血清 5 μ l を注入 (オートサンプラー AS 8020/東ソー) し、カラムからの溶出液 (0.6ml/min) に酵素液 (デタミナー L TC/協和メデックス) を 0.3ml/min で送り込み 45°C で反応 (テフロンチューブ内径 0.4mm、長さ 7.5mm) させた後、A₅₅₀ で検出した。コレステロール濃度既知の血清の面積を基準として、ピークの総面積と自動分割される各分画の面積から総コレステロール量とそれぞれの分画のコレステロール量を算出した。



総合沈澱法による HDL コレステロールの定量は分画試薬 (デタミナー HDL/協和メデックス) を用いて常法どおり分画し、上清分画のコレステロールを日立7070 自動分析装置で測定した。超速心法によるリポ蛋白の標準試料は市販品 (CHEMICON INTERNATIONAL INC) を用いた。

〔結果〕超速心法で分離したリポ蛋白の標準試料 (VLDL, LDL, HDL) を用いて、本システムのサイズによるリポ蛋白の分離を検討した。VLDL と LDL のサイズによる分離は不十分であるが、LDL と HDL の分離は充分であった (図1)。



カラムへの血清注入量とピーク面積の関係を調べたところ血清 1 μ l から 40 μ l まで良好な直線性が得られた。また、臨床例 (n=101) について HPLC 法と自動分析法の総コレステロール量はほぼ一致した (図2)。血清 5 μ l を注入して得られた HPLC パターンを図3に示す (A, プロインスリン血症; B, 家族性高コレステロール血症; C, 高 HDL 血症; D, V 型高脂血症; E, 男子学生; F, 女子学生)、大きさの順に 4 分画に自動分割されピーク 1~4 はそれぞれカイロマイクロン、VLDL、LDL、HDL に対応することが図1の標準試料のパターンと比較することにより確認された。HDL はほとんどの例で独立したピークとして定量できるが、VLDL については通常の検体では含量が少なく、またサイズも LDL に近いためその見積りは現在検討中である。HDL コレステロール量を臨床例 (n=90) について HPLC 法と沈澱法と比較したところ高い相関性がえられた (図4)。沈澱法による値は HPLC 法に比べて有意に低値となった。沈澱法の上清分画の HPLC パターンの面積と全血清の HDL 分画の面積を比較した結果、上清分画への HDL の回収率は約 90% であり HDL が沈澱分画へ混入していることが示唆された。

〔結論〕HPLC 法による総コレステロールや HDL コレステロールの測定値はともに現行の自動分析法や沈澱法と良好な相関を示した。

HPLC法は10分以内で総コレステロールと HDL コレス
 テロールを同時に測定でき、さらに HPLC パターンと病
 態との関連性の解明により本法の臨床面での利用価値が
 高まるであろう。

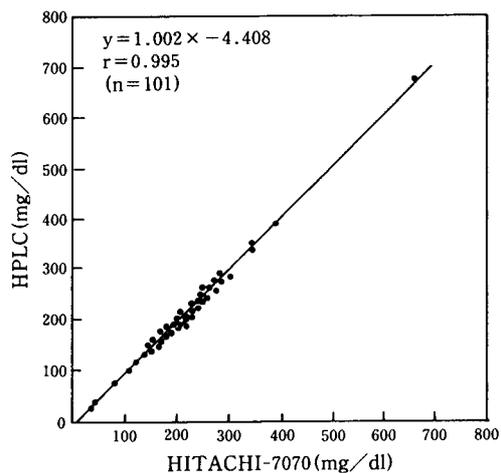


図2 総コレステロールの相関

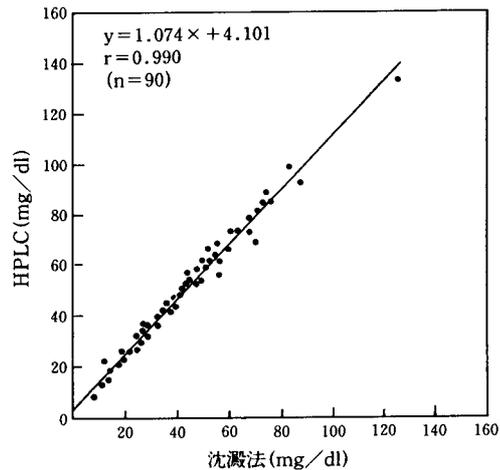


図4 HDLコレステロールの相関

図3

HPLCによる血清リポ蛋白パターン
 コレステロール検出 (mV)

