

## ●自動リポ蛋白分析計 HLC<sup>®</sup>-729LP II の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 システムグループ  
 バイオサイエンス事業部 CSセンター メディカル技サグループ  
 バイオサイエンス事業部 開発部 システムグループ

真仁田 大輔  
 廣渡 祐史  
 庄司 孝四郎  
 杉山 茂孝  
 土方 浩  
 後藤 浩二  
 秋山 聖  
 大野 雄成  
 菅野 詠子  
 岩崎 修次  
 池田 貴文  
 野中 一功

バイオサイエンス事業部 CSセンター 技術管理グループ  
 東ソー・ハイテック株式会社 生産技術課

### 1. はじめに

動脈硬化の進展は、心筋梗塞、脳梗塞、腎障害、網膜症などの発症の原因となることが知られている。動脈硬化の危険因子としては、高血圧、脂質異常症、喫煙、肥満、糖尿病が知られている。これらの疾患を治療することは、動脈硬化性疾患の予防のために重要である<sup>1)</sup>。

国内の脂質異常症患者は潜在的な患者も含めて2000万人を超えると推計されている<sup>2), 3)</sup>。脂質異常症は糖尿病や高血圧に並ぶ代表的な生活習慣病であり、その治療のための精度の高い検査が望まれている。

脂質異常症の診断には、中性脂肪、及びリポ蛋白中のコレステロール（HDLコレステロール、LDLコレステロール）が用いられる<sup>1)</sup>。

リポ蛋白は、コレステロール、中性脂肪、リン脂質、タンパク質の複合体であり、比重と粒子径により、HDL、LDL、VLDLなどに分類される<sup>4), 5)</sup>。リポ蛋白の量を把握するためには、各リポ蛋白を分離し、その中のコレステロールを定量する。リポ蛋白を分離する標準法として超遠心分離法が挙げられるが、操作の煩雑さ、血清使用量の多さや測定時間の長さ（最低3日間）が理由で一般的ではない。リポ蛋白を分離、分析する手法として電気泳動法（アガロースゲル電気泳動等）やゲルろ過クロマトグラフィー法が用いられているが、分離能力が不十分である。

我々は、陰イオン交換クロマトグラフィーとポストカラム法によるコレステロール検出を組み合わせた手法により、リポ蛋白を迅速かつ高精度に分離するシステムの開発を行ってきた<sup>6)</sup>。

専用の液体クロマトグラフィー装置 HLC-729LP II (LP II)、および専用のカラム、溶離液、反応試薬の

開発を進め、1検体当たりの測定時間で5.2分を実現した。本稿では、測定原理、仕様、基本性能などについて報告する。

### 2. 装置概要

LP IIの外観を図1に、主な仕様を表1に示す。装置は、サンプラー部（サンプラー、注入バルブ）、送液部（溶離液ポンプ、反応液ポンプ、パージバルブ、スタティックミキサー）、カラムオープン、検出部（リアクター、可視検出器）、コントローラーからなる構成とした。

### 3. 測定原理

陰イオン交換クロマトグラフィーにより、リポ蛋白の表面に有する電荷の違いにより分離を行う。血清試料を注入すると、リポ蛋白がゲル表面にある正電荷を



本体とコントローラー（PC）から構成される。

図1 HLC<sup>®</sup>-729LP IIの外観

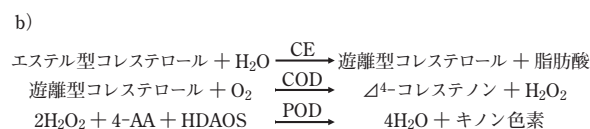
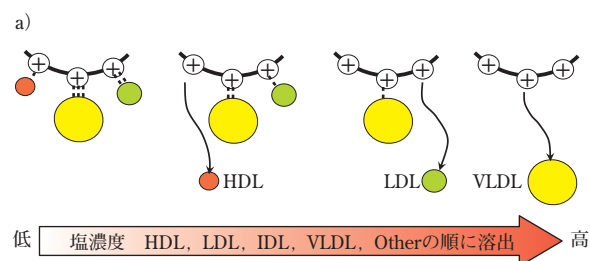
表1 LP IIの主な仕様

仕様	
測定項目	血清中のリポ蛋白分画
測定対象	血清
測定原理	高速液体クロマトグラフィーによる分画/ 酵素反応によるコレステロール発色
試料使用量	200 $\mu$ L
処理速度	5.2分/検体 (プレアクションを含まない)
送液部	
送液ポンプ	溶離液用 3台 (高圧グラジエント、0.625mL/分) 反応液用 1台 (0.25mL/分)
アナライザー	
検出方法	可視吸光検出 (590nm)
検出セット方法	サンプルラック
最大検体搭載数	100 検体 (標準、コントロール等を含める)
注入方法	サンプルループ計量方式による注入
データ処理部	
通信機能	USB 通信 (双方向)
定量計算	ピーク面積による検量線法
制御及びデータ処理	コントローラー
カラム・溶離液・反応液	
カラム	TSK-gel Lipopropak <sup>®</sup> -AEX II
溶離液	LP II 溶離液 第1液 LP II 溶離液 第2液 LP II 溶離液 第3液
反応液	HLC-テスト「TOSOH」リポプロパック <sup>®</sup> (体外診断用医薬品)

もつ交換基に結合する。過塩素酸濃度の異なる3種の溶離液のステップグラジエントによる塩濃度依存的な溶出により、HDL、LDL、IDL、VLDL、Otherの順でリポ蛋白が溶出される。Other画分はカラムを洗浄した際の画分であり、血中で濃度の低い複数のリポ蛋白であるカイロミクロン、カイロミクロンレムナント及びリポプロテイン (a) (Lp(a)) が含まれると考えられる<sup>7),8)</sup>。リポ蛋白溶出の模式図を図2-aに示す。なお、リポ蛋白とゲルの結合は、リポ蛋白の表面電荷だけでなく、表面の疎水性も関与していると考えられる<sup>9)</sup>。

カラムから溶出された各リポ蛋白中のコレステロールを酵素法によって発色させ、可視検出器で検出する。酵素による反応を図2-bに示す。

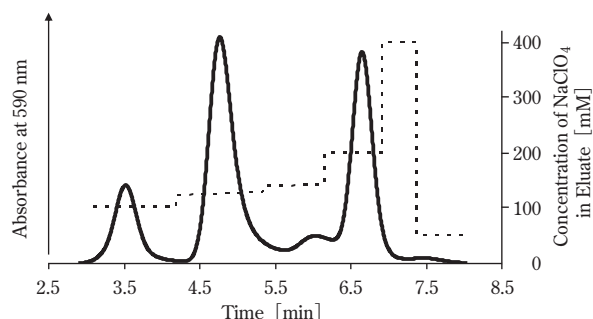
グラジエント条件と脂質異常症患者血清のクロマトグラムを溶出パターンを図3に示す。検体注入の2.9分後から検出が開始され、8.1分後に検出が終了する。検出に要する時間は5.2分であり、連続測定では5.2分毎に結果が得られる。



- a) リポ蛋白溶出の模式図  
b) リポ蛋白中のコレステロール検出反応式

CE: コレステロールエステラーゼ  
COD: コレステロールオキシダーゼ  
POD: ペルオキシダーゼ

図2 LP IIの測定原理



リポ蛋白のクロマトパターンの一例を実線で示した。1検体の測定当たり5.2分を要する (2.9~8.1分)。また、各リポ蛋白の溶出に該当する溶出液中の過塩素酸ナトリウム濃度を点線で示した。

図3 脂質異常症患者のリポ蛋白5分画のクロマトグラムとグラジエント条件の例

#### 4. 基本性能評価結果

##### [1] 再現性試験と希釈直線性試験

###### (1) 同時再現性試験 (n = 10)

HDL、LDL、IDL、VLDL、Other、そして総コレステロール (TC) のコレステロール濃度に関して、変動係数 CV (%) はそれぞれ、0.6、0.3、1.3、0.6、4.3、0.3%であった。

###### (2) 日差再現性 (n = 10)

HDL、LDL、IDL、VLDL、Other、そしてTCのコレステロール濃度に関して、変動係数 CV (%) はそれぞれ4.2、2.4、3.3、4.2、9.2、1.6%であった。

###### (3) 希釈直線性試験

健康人血清を用いて、HDL、LDL、IDL、VLDL、そしてTCに関して、5倍希釈までの直線性を確認した。また、希釈倍率に対する換算濃度と比較して、それぞれ10%以内の正確性を確認した。

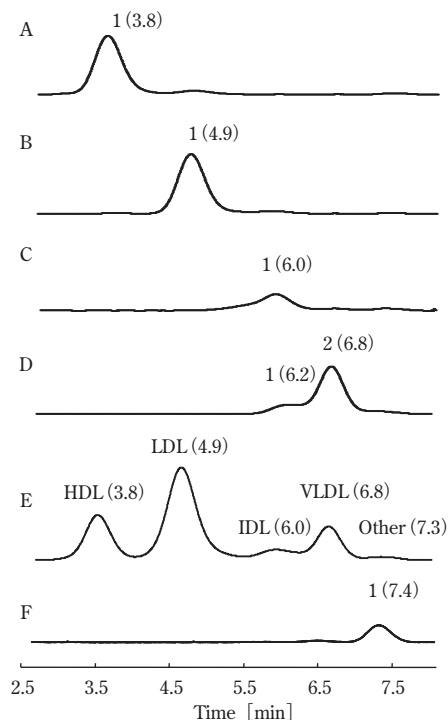
##### [2] 他の測定法との比較

###### (1) 超遠心分離法との相関試験

超遠心分離は、リポ蛋白の比重の違いで分画し、その特性や機能が研究されてきた。現在もリポ蛋白の基準となる測定には、超遠心分離法が使われている。

図4 A-Eでは、血清を超遠心分離法により各リポ蛋白分画に分離し、LP IIで測定した結果を示した。各リポ蛋白の溶出位置と一致していることから、この方法の特異性の高さが示されている。図4 Fは、ヒト血清より精製された Lp(a)をLP IIで測定した結果を示した。Lp(a) コレステロールは、Otherのピーク中に含まれることが確認された。

超遠心分離法とLP IIの測定結果を比較した。35検体の患者血清を超遠心分離により、HDL (比重:1.063g/mL < d)、LDL (比重:1.019 < d < 1.063g/mL)、IDL (比



(A) 超遠心分離法により得られたHDL画分 (比重:1.063g/mL < d)、(B) LDL画分 (比重:1.019g/mL < d < 1.063g/mL)、(C) IDL画分 (比重:1.006g/mL < d < 1.019g/mL)、(D) VLDLとカイロミクロン画分 (比重:d < 1.006g/mL)、(E) 血清検体、(F) 血清より精製されたLp(a)をそれぞれ測定した。括弧内の数値は溶出時間を示す。

図4 超遠心分画サンプルとLp(a)の溶出位置と血清リポ蛋白5分画の溶出位置の比較

重:1.006 < d < 1.019g/mL)、VLDLとカイロミクロン (比重:d < 1.006g/mL) に分画し、各リポ蛋白中のコレステロール量を算出した。これらの値とLP IIによって得られたHDLコレステロール、LDLコレステロール、IDLコレステロール、そしてVLDLコレステロールとOtherコレステロールの量をそれぞれ比較した。

続いて、別の36検体の患者血清を超遠心分離により、VLDLとカイロミクロン画分 (比重:d < 1.006g/mL) を取得しコレステロール分画 (アガロース電気泳動/コレステロール染色) とLP IIで測定を行い、VLDLとカイロミクロン (Other) について比較した。

なお、Lp(a)の比重はHDLからLDLにかけて広く分布することが知られているため<sup>10)</sup>、この相関試験においては、Lp(a)が低値 (Lp(a)タンパク質量40mg/dL以下) の検体を用いている。

相関試験の結果を図5に示す。

全てのリポ蛋白とも良好な相関関係を示した。

###### (2) 直接法との比較

脂質異常症の診断は、HDLコレステロール、LDLコレステロール、中性脂肪 (トリグリセライド: TG) の値を用いる。

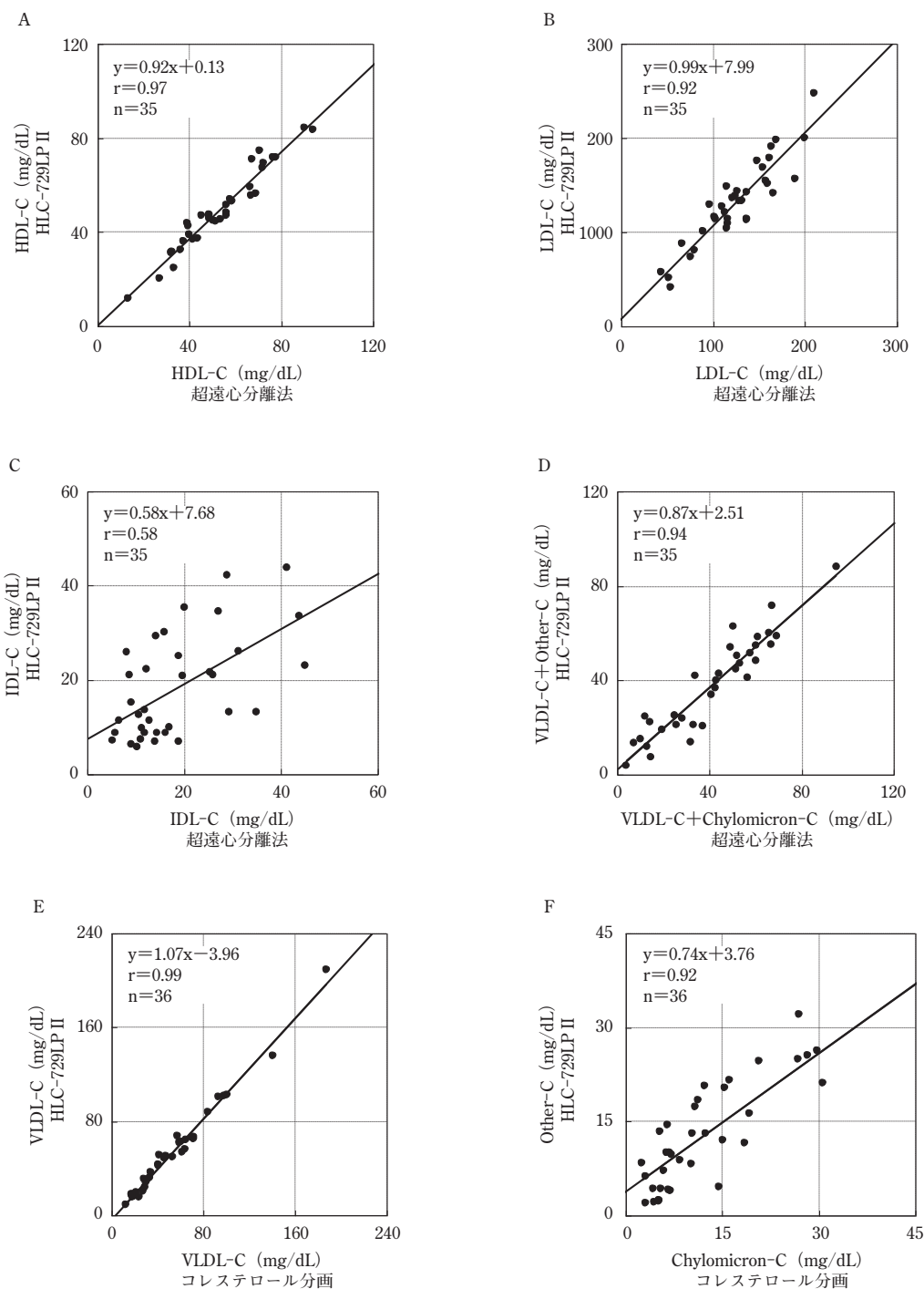


図5 超速心分画との相関試験とコレステロール分画（VLDLとカイロミクロン分画）との相関試験

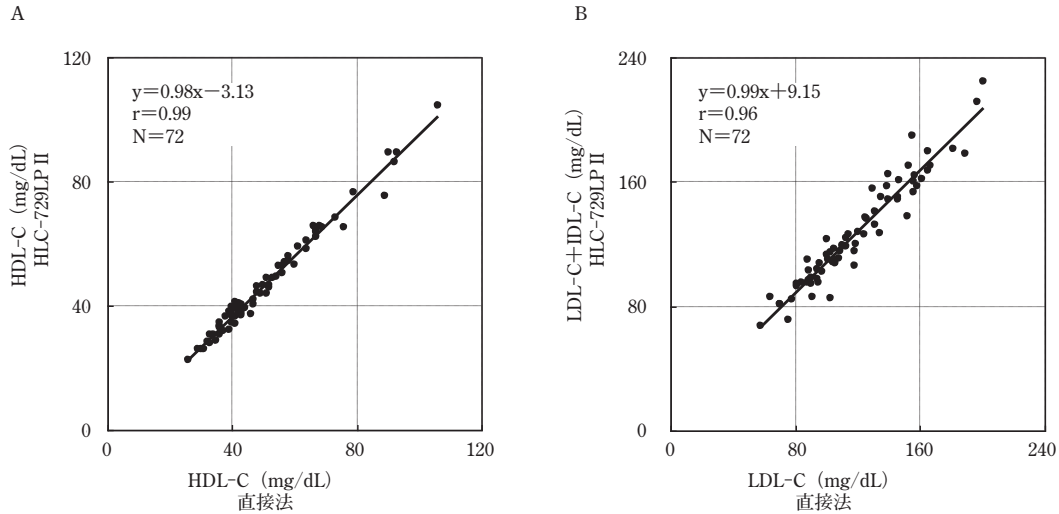
現在、複数の試薬メーカーから、HDLまたはLDLに対して、界面活性剤や酵素のリポ蛋白選択性を利用し、酵素反応でそれぞれのリポ蛋白中のコレステロールを検出するホモジニアス法（直接法）が発売されている。

そこで、LP IIの測定値と、HDL-C（直接法）、LDL-C（直接法）の各測定値との相関を確認した（図6）。いずれにおいても高い相関性が確認された。なお検体はTGが400mg/dL以下の条件を満たすもの

を用いた。

### (3) 電気泳動法との比較

リポ蛋白分画の臨床検査法として、電気泳動法が使用されている。アガロースゲル電気泳動で分離し、コレステロールを染色するコレステロール分画、アガロースゲル電気泳動で分離し、脂質を染色するリポ蛋白分画、そしてポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、脂質を染色するリポ蛋白分画（PAG法）の3手法が保険収載されている。健常者では、これらの測



HDL-CとLDL-Cに関して直接法との相関を比較した。なお、HLC-729 LP IIで測定されたLDL-CとIDL-Cの測定値の和がCDC基準法 (BQ法) によるLDL-Cに相当する。

図6 直接法との比較

定法で、HDL、LDL、VLDLの分離が可能であるが、脂質異常症ではLDLとVLDLの分離不良が見られる場合がある。

脂質異常症患者のLP IIによるクロマトグラムと各種電気泳動法による分離パターンを図7に示した。コレステロール分画とリポ蛋白分画では、LDLとVLDLの分離が出来ていないことがわかる。リポ蛋白分画 (PAG法) では、MIDBANDが検出されている。MIDBANDはIDL、VLDL2など様々なリポ蛋白が含まれており、このピークが検出されることでLDLとVLDLの量の把握が困難となる<sup>12)</sup>。

一方で、HLC-729LP IIのクロマトグラムでは、LDL、VLDLともに高い分離能を有することがわかる。

### 5. HLC-729LP IIによる臨床評価の一例

健常者について、血清中のリポ蛋白5分画のコレステロールと他の検査項目 (Body mass index (BMI)、空腹時血糖 (FPG)、ヘモグロビンA1c (HbA1c)、推定GFR (eGFR)) の相関を評価した。

健常者 (189名、25～59歳、男性、TC: 183 ± 24mg/dL、TG: 74 ± 28mg/dL) を測定対象とした。

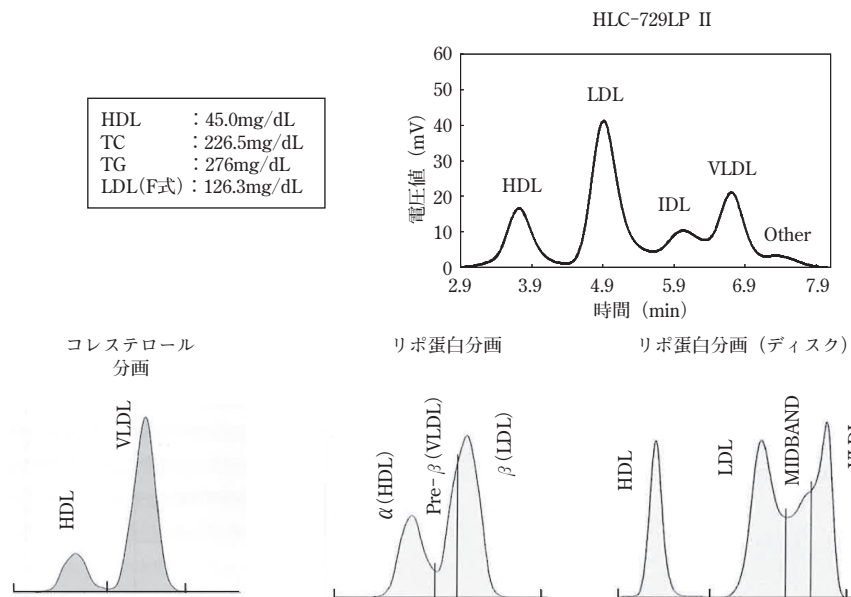


図7 電気泳動法の分離パターン比較

表2 リポ蛋白5分画測定値と検査項目値の相関

Lipoprotein data by HLC-729LP II	BMI	FPG	HbA1c	eGFR
HDL-cholesterol	-0.28 <0.0001	0.039 NS	0.036 NS	0.057 NS
LDL-cholesterol	0.35 <0.0001	0.18 <0.05	0.18 <0.05	-0.19 <0.01
IDL-cholesterol	0.26 <0.0001	0.14 NS	0.10 NS	-0.31 <0.0001
VLDL-cholesterol	0.28 <0.0001	0.020 NS	0.030 NS	-0.19 <0.01
Other-cholesterol	0.037 NS	0.021 NS	0.081 NS	0.11 NS

健常者 189 人の血清検体を HLC-729LP II で測定した。リポ蛋白 5 分画と他の検査項目 (BMI, FPG, HbA1c, eGFR) との相関を評価した。上段に順位相関係数、下段に P 値を記した。P 値が 0.05 以上に関しては NS と表示した。

採血は東ソー株式会社東京研究センターに勤務する従業員に対して実施し、空腹時に行った。健常者は、脂質異常症を除外し、更に、収縮期血圧 140mmHg 以上、拡張期血圧 90mmHg 以上、FPG130mg/dL 以上、HbA1c (NGSP) 6.9% 以上、AST (GOT) または ALT (GPT) が 30U/L より高値、eGFR が 60mL/min/1.73m<sup>2</sup> 以下のいずれかにあてはまる場合には除外した。

リポ蛋白 5 分画と、各検査項目との相関を表 2 に示した。

BMI は HDL-C と負の相関が確認され、LDL-C、IDL-C、そして VLDL-C と正の相関が確認された。FPG 及び HbA1c は LDL-C と正の相関が確認された。eGFR は LDL-C、IDL-C、そして VLDL-C と負の相関が確認された。eGFR は、慢性腎臓病 (CKD) の診断指標に用いられ、腎機能の評価として用いられる。また、透析患者のリポ蛋白プロファイルの特徴として高 IDL が知られており<sup>12)</sup>、このことが透析患者の動脈硬化進展の原因であると考えられている。本システムにより測定が可能となった IDL-C は、腎機能の低下した患者の動脈硬化性疾患の予防のための検査値として有用である可能性が示唆された。

## 6. 保険適用

本システムの装置 HLC-729LP II は医療機器にあたり、反応試薬 HLC-テスト「TOSOH」リポプロパック<sup>®</sup> は体外診断用医薬品にあたる。これまで、多くの大学病院において臨床評価を行い、その有用性を確認してきた。

本システムは、日本動脈硬化学会の推薦により新項目 (E3) として保険適用を取得した。検査名称はリ

ポ蛋白分画 (HPLC 法)、保険点数は 130 点である<sup>13)</sup>。脂質異常症の新しい検査として市場から注目・期待されている。

## 7. 総括

今回開発した HLC-729LP II が、高い再現性と優れた分離性能を有することを確認した。また、本システムによって得られたリポ蛋白 5 分画の測定結果は、超遠心法や直接法とも高い相関を有し、脂質異常症患者の高脂血症分類の診断、治療観察に利用できる<sup>13)</sup>。

HDL や LDL と比較して、IDL や VLDL の機能や役割はまだ未解明な部分が多い。本システムが臨床現場に適用され、HDL、LDL のみならず、IDL、VLDL の測定が動脈硬化性疾患や糖尿病合併症の治療や予防に大きく貢献することを期待する。

## 8. その他

本研究で用いた検体は、東京慈恵会医科大学または東ソー株式会社の倫理委員会の承認を得て実施された。採血には同意書による確認の元に実施され、個人名を削除し別の符号で管理されて検討を実施した。

本報告中にある“HLC”、“リポプロパック”、“TSKgel”、“Lipopropak”は日本における東ソー株式会社の登録商標です。

## 9. 謝辞

本装置の研究及び開発は、東京慈恵会医科大学と産学協同で進めてきた。

ご協力いただいた各先生方に厚く御礼申し上げます。

す。

東京慈恵会医科大学附属柏病院 中央検査部

吉田 博 先生

東京慈恵会医科大学附属柏病院

多田 紀夫 先生

印西総合病院 検査部

黒澤 秀夫 先生

13) 中医協 総-1 25. 6. 26, 第 244 回中央社会保険医療協議会総会資料

## 参考文献

- 1) 脂質異常症検査. 臨床検査のガイドライン  
JSLM2012 検査値アプローチ / 症候 / 疾患、日本臨床検査医学会、37-42、2012
- 2) 第5次循環器疾患基礎調査、厚生労働省
- 3) 平成22年国民健康・栄養調査、厚生労働省
- 4) Dominiczak MH. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. Handbook of lipoprotein testing Second edition, AACC press. 1-30, 2000
- 5) リポタンパク質の分画・精製. 新生化学実験講座 4 脂質 I 中性脂肪とリポタンパク質、日本生化学会編 東京化学同人. 181-228, 1993
- 6) Hirowatari Y, et al., Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. J Lipid Res 44, 1404-1412, 2003
- 7) Ito K, et al, Relevance of intermediate-density lipoprotein cholesterol to Framingham risk score of coronary heart disease in middle-aged men with increased non-HDL cholesterol. Int J Cardiol., 168, 3853-3858, 2013
- 8) Hirowatari Y, et al., Analysis of cholesterol levels in lipoprotein(a) with anion-exchange chromatography. J Lipid Res., 51, 1237-1243, 2010
- 9) 昆美香、他、HPLCを用いたリポ蛋白分析法 JJCLA, 34, 135-144, 2009
- 10) Gert M. Kostner, et al., Preparation of a stable fresh frozen primary lipoprotein[a] (Lp[a]) standard. J lipid Res., 40, 2255-2263, 1999
- 11) 黒澤 秀夫、他、新規 HPLC 法により分離定量された各リポ蛋白中コレステロール値と midband、RLP-コレステロールとの関連性 臨床病理、52、737-741、2004
- 12) Shoji T, et al., Intermediate-density lipoprotein as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients. J Am Soc Nephron., 9, 1277-1284, 1998