

技術論文

高速液体クロマトグラフィーによる血清リポタンパク質の分析

北村 隆司^{®*}, 伊藤 誠治*, 加藤 芳男*,
 笹本 恵子**, 岡崎 三代**

Analysis of serum lipoproteins by high performance gel filtration chromatography

Takashi KITAMURA, Seiji ITO, Yoshio KATO*, Keiko SASAMOTO and Mitsuyo OKAZAKI**

*Separation Center, Tosoh Corporation, 4560, Kaisei, Shinnanyo-shi, Yamaguchi 746;

**Laboratory of Chemistry, Department of General Education, Tokyo Medical and Dental University, 2-8-30, Kohnodai, Ichikawa-shi, Chiba 272

(Received 27 July 1995, Accepted 3 October 1995)

We evaluated a new gel filtration column and eluent commercially available under the trade-names of TSKgel Lipopropak and TSKeluent LP-1 for the analysis of serum lipoproteins. Lipoproteins were separated within about 20 min, and were detected by post column reaction using the cholesterol oxidase-peroxidase system. Total and high density lipoprotein(HDL) cholesterol could be quantified every 10 min, with high recovery and high reproducibility.

Keywords : analysis of serum lipoproteins; high-performance gel filtration chromatography; TSKgel Lipopropak; TSKeluent LP-1; total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol.

1 緒 言

血清リポタンパク質は、コレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)、リン脂質などの脂質とアポリタンパク質が会合した、脂質とタンパク質の複合体であり、アポリタンパク質の種類や脂質の含有量などの異なる幾つかの種類がある。

現在、リポタンパク質の分析ではコレステロールの測定が最も日常的に行われており、分析法としては、超遠

心法、電気泳動法、沈殿法、免疫比濁法、HPLC法などが用いられている¹⁾。HPLC法としては、ゲル濾過クロマトグラフィーが一般的であり、ポストカラム反応との組み合わせにより、リポタンパク質中のコレステロールを検出することが多い^{2)~7)}。しかし、HPLC法においては、リポタンパク質の分離に用いられるカラム充填剤へのリポタンパク質の吸着の問題があるため、一般にはほとんど利用されていない。

そこで著者らは、最近市販されるようになったリポタンパク質分析用ゲル濾過カラム TSKgel Lipopropak と溶解液 TSKeluent LP-1 を用いて、HPLCによる血清リポタンパク質中のコレステロールの分析を行ったので、その結果について報告する。

* 東ソー(株)セパレーションセンター: 746 山口県南陽市開成町 4560

** 東京医科歯科大学教養部: 272 千葉県市川市国府台 2-8-30

2 方 法

2・1 試 料

健常者血清及び患者血清を用いた。

2・2 装置及び試薬

装置は、はん用 HPLC システム・CCP&8020 シリーズ (東ソー) を用いた。Fig. 1 に本分析法に用いた装置の構成図を示す。カラムはリポタンパク質分析用ゲル汙過カラム TSKgel Lipopropak (東ソー, 内径 7.5 mm, 長さ 30 cm) を使用した。溶離液はリポタンパク質分析用 TSKeluent LP-1 (東ソー) を使用した。

酵素法及び沈殿法による総コレステロール及び HDL コレステロールの測定には、日立 7070 型自動分析装置を使用した。

HPLC 法及び酵素法のコレステロール測定試薬は、データミナー L TC (協和メデックス) を使用した。データミナー L TC は前処理液 (試薬 R-1) と酵素液 (試薬 R-2) で構成され、前処理液でアスコルビン酸オキシダーゼによる検体中のアスコルビン酸の除去と、コレステロールエステラーゼによるコレステロールエステルの加水分解を行い、次いで酵素液で遊離コレステロールにコレステロールオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと発色剤で比色定量する試薬である。

HDL コレステロール分画試薬 (沈殿法) はデータミナー HDL (協和メデックス) を使用した。データミナー HDL は、デキストラン硫酸-Mg 法及びリンタングステン酸-Mg 法を組み合わせた HDL 分画試薬で、血清中の HDL 以外のリポタンパク質の表面に存在するアポタンパク B にポリ陰イオン (デキストラン硫酸, リンタングステン酸) が結合し、更に二価陽イオン (Mg^{2+}) が結合して沈殿を形成する試薬であり、遠心分離後、上澄みに残存する HDL 画分が測定される。

標準血清は、WCHL931M, WCHL931H (化学品検査協会) を使用した。管理血清は、EXA Liquid 5 normal (三光純薬) を使用した。

2・3 測定方法

血清を前処理せずにカラムに直接注入し、リポタンパク質の分離に有効な細孔を有する充てん剤を用いたゲル汙過クロマトグラフィーによって、血清リポタンパク質を粒子サイズに基づいて分離し、そのカラム溶出液とコレステロール測定試薬とのポストカラム反応によって、リポタンパク質中のコレステロールを検出した。

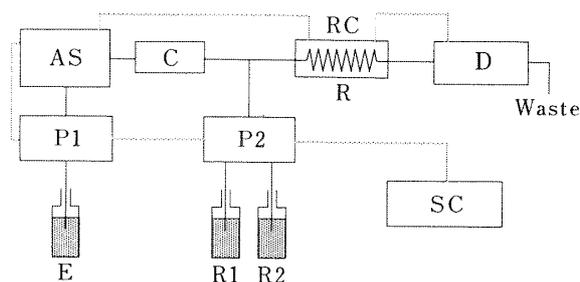


Fig. 1 Schematic diagram of the chromatographic system

P1, P2: pump; AS: autosampler; C: column; RC: reaction coil; R: reactor; D: detector; SC: system controller; E: eluent; R1, R2: postcolumn reagent

コレステロール量の計算は、コレステロール濃度既知の標準血清の一点検量線法により行った。

2・4 測定条件

血清注入量: 5 μ l (標準条件), 溶離液の流量: 0.60 ml/min, 反応液の流量: 0.30 ml/min (試薬 R-1: 試薬 R-2=3:1), カラム温度: 25°C, 反応温度: 45°C, 反応コイル: 内径 0.4 mm, 長さ 7.5 m (東ソー, テフロンチューブ), 検出波長: 550 nm

3 結果及び考察

3・1 リポタンパク質の吸着性の検討

コレステロール濃度が 193.8 mg/dl (WCHL 931M) 及び 239.7 mg/dl (WCHL 931H) の標準血清を、それぞれ 5 μ l カラムに注入し分析を行った。又、カラムを取り外してリポタンパク質の吸着がない、内径 2.2 mm, 長さ 27.5 cm の PFA (四フッ化エチレン-ペルフルオロアルキルビニルエーテル樹脂) チューブを装着し、同様に分析を行い、両者のクロマトグラムの総面積を比較する方法により、リポタンパク質のカラム充てん剤への吸着性を調べた。

その結果、いずれの濃度の場合も 99.8% 以上の高い回収率が得られ、TSKgel Lipopropak 及び TSKeluent LP-1 を用いたリポタンパク質の分析では、カラム充てん剤へのリポタンパク質の吸着がないことが確認された。

3・2 定量性の検討

総コレステロール濃度が 193.8 mg/dl の標準血清 (WCHL 931M) を用いて、注入量を 1, 2, 5, 10, 20 μ l まで変化させて測定を行い、血清注入量と総ピーク

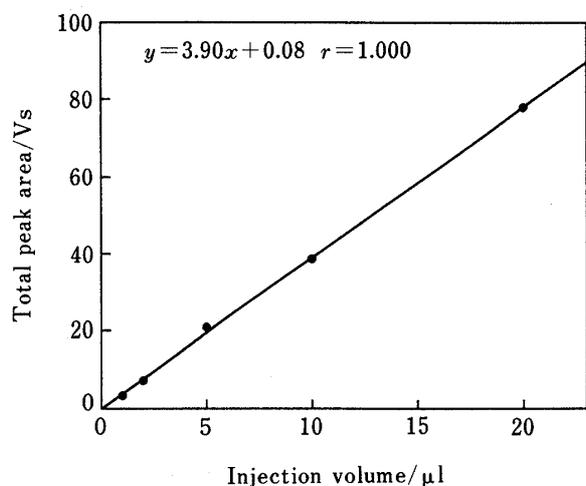


Fig. 2 Relationship between injection volume and total peak area

面積 (総コレステロール) との関係調べた。その結果を Fig. 2 に示すが、両者の間には、回帰式 $y=3.90x+0.08$ 、相関係数 $r=1.000$ のほぼ原点を通る良好な直線関係が認められた。

又、この結果を標準測定条件での血清注入量 (5 μ l) における総コレステロール濃度に換算した場合、38.7~775mg/dl に相当し比較的広範囲での測定が可能であることが分かった。

3.3 再現性

健常者血清を用いて標準測定条件で総コレステロール及び HDL コレステロールを測定し、同時再現性及び日差再現性を調べた結果を Table 1 に示す。同時再現性については、総コレステロール及び HDL コレステロールの RSD がそれぞれ 0.49, 0.65% の良好な結果が得られた。又、日差再現性についても総コレステロール及び HDL コレステロールの RSD が、それぞれ 1.46, 2.42% の良好な結果であった。

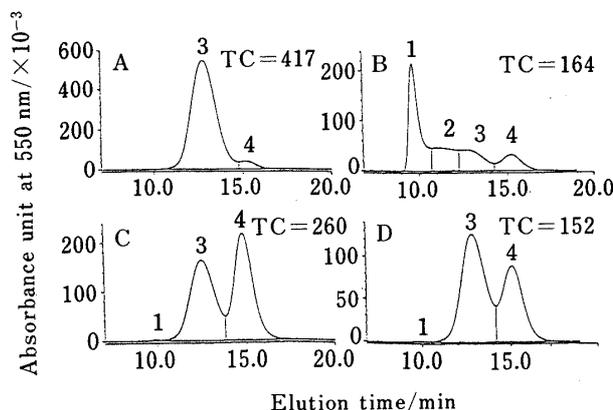


Fig. 3 Cholesterol profiles of serums from patients with various diseases by high-performance gel filtration chromatography on TSKgel Lipopropak

A: familial hypercholesterolemia; B: hyperlipidemia; C: hyper(high-density)lipoproteinemia; D: normal; 1: CM; 2: VLDL; 3: LDL; 4: HDL

3.4 カラムの耐久性

健常者血清及び患者血清を試料として、標準測定条件で連続測定を行いカラムの耐久性を調べた。150 検体測定後ごとに管理血清 (EXA Liquid 5 normal) を測定し、LDL と HDL の溶出時間及び分離能、総コレステロール及び HDL コレステロールの値を調べたところ、1650 検体までいずれも変化が認められなかった。従って、少なくとも 1500 検体以上の測定が可能であり、カラム耐久性は良好であった。

3.5 他法との相関性

健常者血清及び入院患者血清を用いて、本 HPLC 法で測定した数例のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。血清リポタンパク質は大きさの順にカイロミクロン (CM), 超低比重リポタンパク質 (VLDL), 低比重リポタンパク質 (LDL) 及び HDL に分離される。総コレステロールはクロマトグラムの総面積、又 HDL コレ

Table 1 Reproducibility of the present method.

	Within-day (n=20)		Day-to-day (n=5)	
	T-CHO	HDL-CHO	T-CHO	HDL-CHO
Mean (mg/dl)	181.8	58.4	189.8	57.8
SD	0.93	0.38	2.77	1.40
RSD, %	0.49	0.65	1.46	2.42

T-CHO: total cholesterol, HDL-CHO: HDL cholesterol

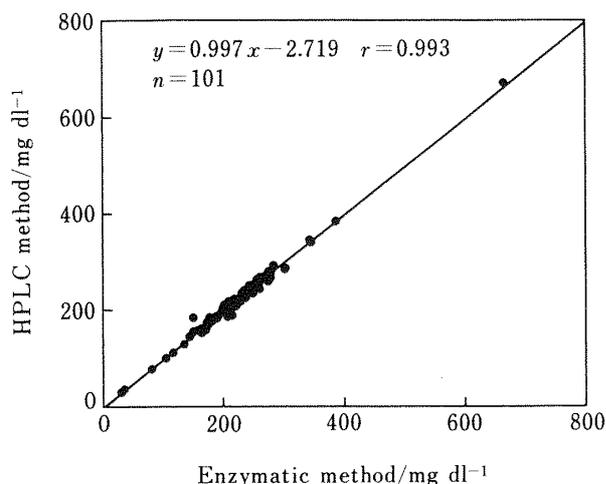


Fig. 4 Correlation between total cholesterol concentrations determined by the enzymatic method and the HPLC method

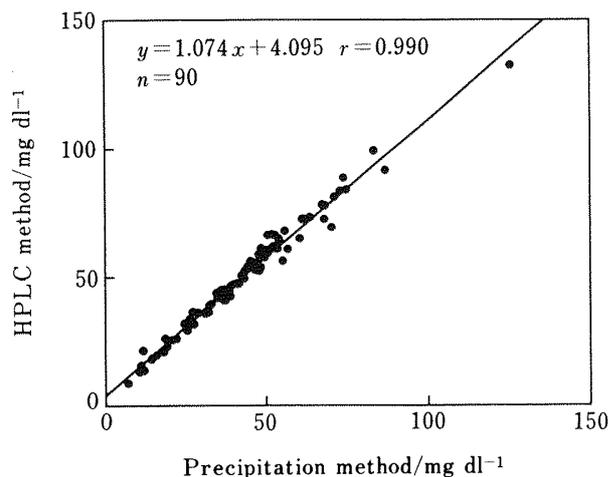


Fig. 5 Correlation between HDL cholesterol concentrations determined by the precipitation method and the HPLC method

ステロールは LDL と谷分割をした HDL の面積から求めた。それらの結果と自動分析装置による測定値の相関性を Fig. 4, 5 に示す。

総コレステロールについては、回帰式 $y=0.997x-2.719$ 、相関係数 $r=0.993$ 、HDL コレステロールについては、回帰式 $y=1.074x+4.095$ 、相関係数 $r=0.990$ の良好な相関性が得られた。

以上の結果より、リポタンパク質分析用ゲル濾過カラム TSKgel Lipopropak と溶離液 TSKeluent LP-1 を用いた HPLC によるリポタンパク質の分析では、リポタンパク質の分離に使用されるカラム充てん剤へのリポタンパク質の吸着の問題が解決され、再現性よく血清リポタンパク質中の総コレステロール及び HDL コレステロールを短時間で同時分析できることが分かった。又、HDL 以外の画分については、分離が十分でないため各画分を正確に測定することは困難であった。しかし、今後更に検討を加えれば分析可能なことが示唆された。

更に、本 HPLC 法は試料の前処理を必要とせず、簡便かつ自動分析が可能であるため日常検査にも有用と思われる。

文 献

- 1) 中村治雄：“脂質の科学”，p. 118 (1990)，(朝倉書店)。
- 2) M. Okazaki, Y. Ohno, I. Ohara: *J. Chromatogr.*, **221**, 257 (1980)。
- 3) M. Okazaki, K. Shiraishi, Y. Ohno, I. Hara: *J. Chromatogr.*, **223**, 285 (1981)。
- 4) M. Okazaki, I. Hara, A. Tanaka, T. Kodama, S. Yokoyama: *N. Engl. J. Med.*, **304**, 1608 (1981)。
- 5) I. Hara, K. Shiraishi, M. Okazaki: *J. Chromatogr.*, **239**, 549 (1982)。
- 6) M. Okazaki, H. Itakura, K. Shiraishi, I. Hara: *Clin. Chem.*, **29**, 768 (1983)。
- 7) I. Hara, M. Okazaki: “*Methods in Enzymology*”, **129**, p. 549 (1986), (Academic Press, Orlando)。

要 旨

市販のリポタンパク質分析用ゲル濾過カラム TSK gel Lipopropak と溶離液 TSKeluent LP-1 を用いて、HPLC による血清リポタンパク質の分析を行った。その結果、本カラムと溶離液を用いた分析では、カラム充てん剤へのリポタンパク質の吸着がなく、再現性よく血清リポタンパク質を分離することができ、ポストカラム反応との組み合わせにより、総コレステロール (T-CHO) と高比重リポタンパク質コレステロール (HDL-CHO) の分析が可能であった。又、本分析法は、試料の前処理を必要とせず、検体を約 10 分間隔で分析できるため、簡便な血清リポタンパク質中のコレステロールの分析法として有用と思われる。