

〈企業特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開〉

イオン交換クロマトグラフィーによるリポ蛋白分析法の 研究開発とリポ蛋白電気泳動との比較

廣渡 祐史

Research and development of anion-exchange chromatographic method for measurement of cholesterol levels of lipoprotein classes and comparison with electrophoretic methods

Yuji Hirowatari

Summary Lipoprotein classes can be separated by electrophoresis which is generally used for routine tests in clinical laboratories. However, the electrophoretic methods do not have sufficient ability to separate lipoprotein classes. Especially, LDL and VLDL can not be separated by electrophoresis in same diabetic patients with dyslipidemia. We started research to find a convenient method for separation of lipoprotein classes and reached an appropriate condition of an anion-exchange chromatographic method. Lipoproteins in serum are bound on anion-exchange chromatographic media and eluted by using step-wise elution of perchlorate ion. HDL, LDL, IDL and VLDL can be separated by this method. Cholesterol levels in the separated lipoprotein classes are detected by the post-column reaction with enzymatic reagent.

The newly developed method has good resolution, high reproducibility and good correlation with electrophoretic methods. Therefore, the new anion-exchange chromatographic method can be adopted for routine clinical laboratory test.

Key words: Lipoprotein, Anion-exchange chromatographic method, Clinical laboratory test

I. はじめに

2000年の第5次循環器疾患基礎調査（厚生労働省）によると、国内の脂質異常症患者は潜在的な患者も含めて2,000万人を超えると推計され、高血圧や糖尿病に並ぶ代表的な生活習慣病と言える。また、動脈硬化性疾患予防ガイドラ

イン2012年版（日本動脈硬化学会）の動脈硬化性疾患 予防包括的リスク管理チャートには、脂質異常症、高血圧、糖尿病について具体的な管理目標が示された¹⁾。

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、中性脂肪の3つの検査により行われる²⁾。脂質異常症と診断されると脂質

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部
〒252-1123 神奈川県 綾瀬市 2743-1
E-mail: yuji-hirowatari-bx@tosoh.co.jp

Bioscience Division, Tosoh Corporation.
2743-1 Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa 252-1123,
Japan

異常症を起こした原因疾患の特定を行うが、補助的な検査としてリポ蛋白電気泳動を行い、各リポ蛋白分画（HDL、LDL、IDL、VLDL、カイロミクロン）の量を確認する³⁾。また、リポ蛋白電気泳動は薬物治療・食事療法・運動療法などの効果を把握するためにも有用である。

リポ蛋白は、超遠心分離法を適用して比重により分類された^{4,5)}。現在でも、超遠心分離法はリポ蛋白の基準的な分離・分析法として、研究用途として幅広く使われている。しかしながら、超遠心分離法は手技が煩雑で時間も要し必要とする検体量も多いため、臨床検査の用途として電気泳動法が保険収載されている。主として荷電で分離するアガロースゲル電気泳動法（検査項目名：リポ蛋白分画、以下、リポ蛋白分画）⁶⁾と、主として粒子サイズで分離するポリアクリルアミドゲル電気泳動法（検査項目名：リポ蛋白分画（PAGディスク電気泳動法）、以下、リポ蛋白分画PAG）⁷⁾がある。これらの電気泳動法では、脂質と結合する色素を用いてリポ蛋白を検出する。また、アガロースゲル電気泳動法でリポ蛋白を分離後、リポ蛋白中のコレステロールを染色するコレステロール分画（検査項目名：コレステロール分画、以下、CHO分画）がある⁸⁾。ただし、これら電気泳動法は簡便ではあるが、超遠心分離法に比べて分離能が低く、脂質異常を持つ一部の糖尿病患者でLDLとVLDLの分離不良が生じることが知られている⁹⁾。

我々は、超遠心分離法に匹敵する分離能を有し、電気泳動法のように日常の臨床検査に適用できる新たなリポ蛋白に関する分離・分析法を創出することを目的として研究開発を開始し、イオン交換クロマトグラフィーによるリポ蛋白分析法（検査項目名：リポ蛋白分画（HPLC法）、以下、AEX-HPLC）を確立した。

II. 研究開発の経緯

原、岡崎らは、1980年代からゲル濾過クロマトグラフィーによる血清中のリポ蛋白分析を検討し、多くの成績を発表している^{10,11)}。ゲル濾過クロマトグラフィーでは、LDLとVLDLの分離は十分ではなく、それを克服するために数学的手法（ガウス近似法）を使って各リポ蛋白分画の推定値を導いた¹¹⁾。

我々は、ゲル濾過クロマトグラフィーによるリポ蛋白の分離を改善させるため、ゲルの改良、溶離液組成の検討を行った。ゲルについては、ゲルの孔（ポアサイズ）の最適化、また、ゲル

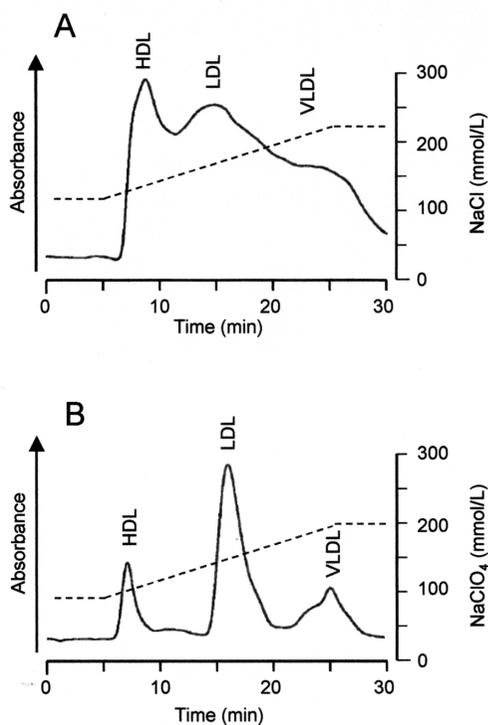


図1 リニアグラディエント溶出による血中リポ蛋白のクロマトグラム。
 A：陰イオン交換カラム：DEAE交換基、ノンポーラスタイプ、粒径2.5ミクロン、サイズ3.5 mmI.D.×35 mm。
 溶離液：1液（50 mmol/L sodium phosphate + 3 mmol/L EDTA2Na pH7.5）、2液（50 mmol/L sodium phosphate + 3 mmol/L EDTA2Na + 500 mmol/L sodium chloride pH7.5）。溶離液の流速：0.6 mL/min。
 B：陰イオン交換カラム：DEAE交換基、ノンポーラスタイプ、粒径2.5ミクロン、サイズ3.5 mmI.D.×35 mm。
 溶離液：1液（50 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA2Na pH7.5）、2液（50 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA2Na + 1000 mmol/L sodium perchlorate pH7.5）。溶離液の流速：0.6 mL/min
 図中の実線はリポ蛋白を、点線はリニアグラディエント溶出の塩濃度を示した。

の孔（ポアサイズ）の異なるゲルを混合しカラムに充填するなどを試みた。溶離液については、pH、塩濃度、緩衝液の種類を検討し、さらに、溶離液に種々のアミノ酸を添加するなどを試みた。しかしながら、LDLとVLDLの分離の改善には至らなかった。そのため、異なる分離モードであるイオン交換クロマトグラフィーの検討を開始した。リポ蛋白はアポリボタンパク質、リン脂質、遊離コレステロール、エステル型コレステロール、中性脂肪を含む粒子であり、表面の疎水性が比較的高くゲル表面に非特異的な吸着を起しやすいこと、一般的なタンパク質に比べて構造が脆弱なことが推定される。陰イオン交換クロマトグラフィーのゲル表面に直接にリポ蛋白を結合させると非特異的な吸着やリポ蛋白の構造変化により良好な分離の実現が困難と考え、陽イオン交換クロマトグラフィーの交換基に金属イオンを配位させた後にリポ蛋白を吸着させることを考案した。溶離液中の金属イオンを高めることにより、各リポ蛋白を溶出さ

せた¹²⁾。この方法によると、HDL、LDL、VLDLの分離は可能であったが、IDLの分離は困難であった。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーを検討した。塩化ナトリウムのリニアグラデーション溶出による分離では推測通り良好な分離は得られなかったが、用いる塩を過塩素酸ナトリウムにするとHDL、LDL、VLDLの分離が可能となった（図1）。過塩素酸イオンはカオトロピック効果を持ち疎水結合を減弱させることが可能である¹³⁾。溶離液中の過塩素酸イオンの存在が、リポ蛋白とゲル表面に存在する疎水性による非特異吸着を低減したことにより分離を改善したと推測された。さらに、溶出条件にステップワイズ溶出を適用することにより、20 min/testの分析時間でHDL、LDL、IDL、VLDLの分離を実現した¹⁴⁾。日常の臨床現場で多く適用できるように、カラムサイズ、流速などを最適化し測定時間を20 min/testから5.2 min/testに短縮した（図2）。

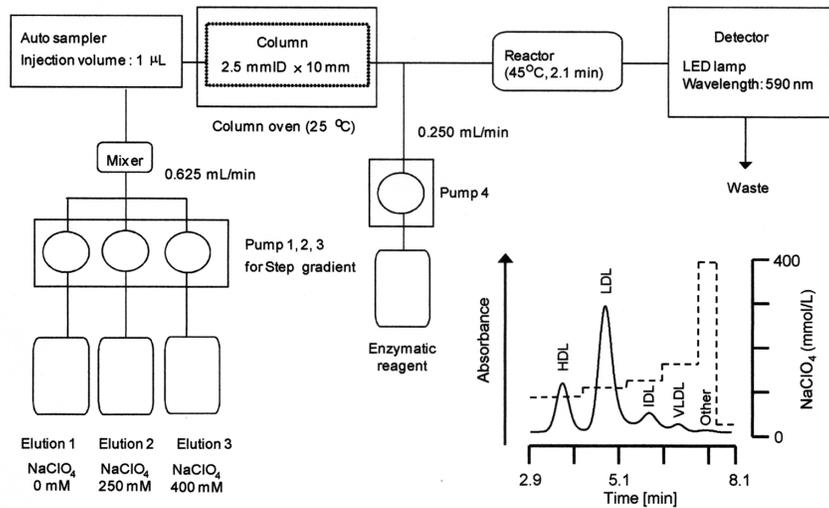


図2 リポ蛋白分析システムの装置構成とステップワイズ溶出による血中リポ蛋白のクロマトグラム。
陰イオン交換カラム：DEAE交換基、ノンポーラスタイプ、粒径2.5ミクロン、サイズ2.5 mmI.D.×10 mm。
溶離液：1液（50 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA2Na pH7.5）、2液（50 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA2Na + 250 mmol/L sodium perchlorate pH7.5）、3液（50 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA2Na + 400 mmol/L sodium perchlorate pH7.5）。
反応試薬（主成分）：コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、HDAOS。
Other分画には、カイロミクロン、カイロミクロンレムナント、Lp(a)などが含まれると推定される¹⁴⁻¹⁶⁾。

生物試料分析

表1 日差再現性および同時再現性のデータ

Lipoprotein	Lipoprotein rates (Peak area rates)						Cholesterol Concentration					
	Between Assay (n=10)			Within Assay (n=10)			Between Assay (n=10)			Within Assay (n=10)		
	Mean (%)	SD (%)	C.V. (%)	Mean (%)	SD (%)	C.V. (%)	Mean (%)	SD (%)	C.V. (%)	Mean (%)	SD (%)	C.V. (%)
HDL	12.6	0.61	4.84	12.8	0.08	0.61	37.9	1.74	4.60	38.4	0.25	0.65
LDL	66.9	0.87	1.30	66.7	0.11	0.17	201.0	4.76	2.37	200.5	0.66	0.33
IDL	7.5	0.21	2.82	7.2	0.08	1.11	22.4	0.73	3.27	21.7	0.27	1.25
VLDL	11.6	0.50	4.31	11.8	0.09	0.74	34.8	1.46	4.20	35.4	0.20	0.57
Other	1.4	0.12	8.38	1.5	0.06	4.14	4.2	0.39	9.19	4.4	0.19	4.31

リポ蛋白比率 (lipoprotein rates) は、各リポ蛋白ピーク面積とすべてのピークのトータル面積から算出した。C.V.: 変動係数、S.D.: 標準偏差、ヒトプール血清 (凍結乾燥品: TC = 281 mg/dL、TG = 179 mg/dL) を使用した。

表2 各リポ蛋白分画コレステロール値の保存安定性データ (4℃)

		Stored days at 4℃								
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Cholesterol Level (mg/dL)	HDL	37.6	36.2	35.6	36.4	35.9	35.2	35.4	35.4	
	LDL	144.8	143.3	141.2	143.2	143.3	140.9	142.3	141.9	
	IDL	14.2	12.7	13.1	14.5	13.1	13.8	13.0	13.1	
	VLDL	25.1	25.3	25.7	26.7	26.9	26.4	26.1	26.3	
	Other	2.7	2.5	2.4	2.3	2.5	2.1	2.9	2.7	
Comparison of the level at 0 day (%)	HDL	100	95	95	97	95	94	94	94	
	LDL	100	99	98	99	99	97	98	98	
	IDL	100	89	92	102	92	97	92	92	
	VLDL	100	101	102	106	107	105	104	105	
	Other	100	93	89	85	93	78	107	100	

Ⅲ. 基本性能

AEX-HPLC (測定時間5.2 min/test) の分析条件について基本性能を次に述べる。

同時再現性および日差再現性を評価した (表1)。同時再現性については、各リポ蛋白分画の面積比 (%) およびコレステロール濃度 (mg/dL) のC.V.は、それぞれ0.61~4.14%、0.33~4.31%となった。日差再現性の各リポ蛋白分画の面積比 (%) およびコレステロール濃度 (mg/dL) のC.V.は、それぞれ1.30~8.38%、2.37~9.19%となった。

血清の冷蔵保存 (4℃) の安定性を評価した (表2)。7日後のHDL、LDL、IDL、VLDL、Other (Other分画には、カイロミクロン、カイロミクロンレムナント、Lipoprotein (a)が含まれている¹⁴⁻¹⁶⁾) の測定値 (mg/dL) は採血日のデータに比べ、それぞれ94%、98%、92%、105%、100%となった。

テルモ (ベノジェクトⅡ:P (凝固促進フィルム)、AS (血清分離剤、凝固促進フィルム))、

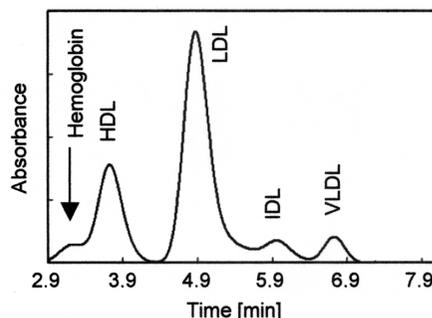


図3 ヘモグロビン (400 mg/dL) を添加した血清試料のクロマトグラム。

積水メディカル (インセパックⅡ:ST (血清分離剤、凝固促進剤)、SQ (血清分離剤、高速凝固促進剤))、バクトン・ディッキンソン (BDバキュテイナ:STTⅡ (血清分離剤、凝固促進用シリカ微粒子))、ニプロ (ネオチューブ:SP (血清分離剤、高速凝固促進剤)) の4社6種類の採血管を用いて、3人の健常者から採血を实

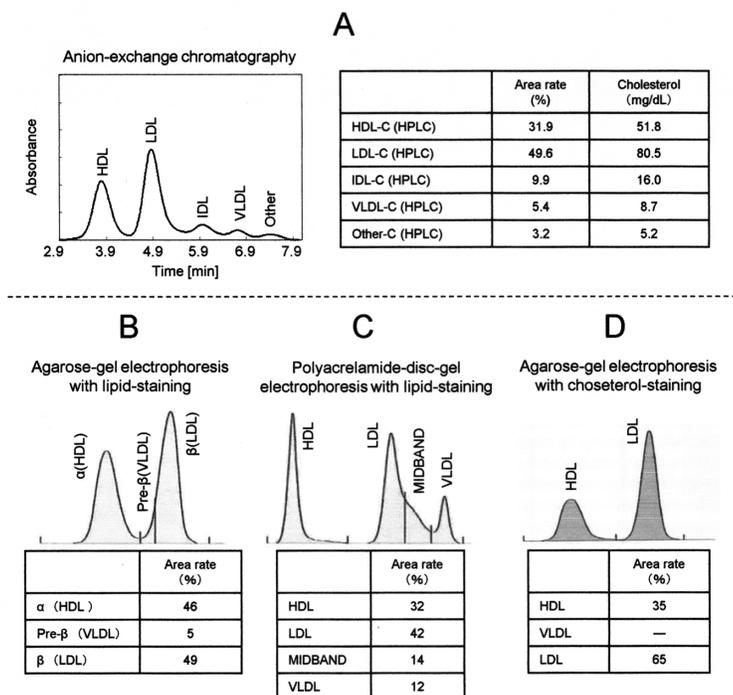


図4 陰イオン交換クロマトグラフィーと3つの電気泳動法との比較（健常者）。
血清の脂質データ：HDL-C = 53 mg/dL、LDL-C = 84 mg/dL、Total-CHO = 152 mg/dL、TG = 75 mg/dL。

施し血清を取得し測定値を比較した。平均値 (mg/dL) と比較して、HDL、LDL、IDL、VLDL、Otherの測定値 (mg/dL) は、それぞれ98~101%、97~103%、80~113%、96~105%、87~107% となった。

共存物質については、ヘモグロビンについては添加濃度400 mg/dL、遊離型ビリルビンについては添加濃度20 mg/dL、抱合型ビリルビンについては添加濃度20 mg/dL、アルブミンについては添加濃度50 mg/mL、リウマチ因子については添加濃度550 IU/mL、EDTA2K・2水和物については添加濃度10 mg/mL、クエン酸3ナトリウムについては添加濃度20 mg/mL、ヘパリンについては添加濃度100 U/mL、アスコルビン酸については添加濃度8 mg/dLまで、測定値に影響を与えないことを確認しているが、ヘモグロビンを400 mg/dL添加した際のクロマトグラムでは、HDLの前に小さなピークが見られた(図3)。この小さなピークはヘモグロビンに由来しており、血清に溶血ヘモグロビン試料(干渉チェックA

プラス、シスメックス製)を400 mg/dL濃度添加すると、HDLコレステロール値が2~3 mg/dL程度高値となる。このことから、強溶血検体ではHDLコレステロールの測定値に注意が必要である。

IV. リポ蛋白電気泳動との比較

健常者の血清について、AEX-HPLC(測定時間5.2 min/test)と既存のリポ蛋白電気泳動(リポ蛋白分画、リポ蛋白分画PAG、CHO分画)と分離パターンについて比較を行った(図4)。リポ蛋白分画(図4B)ではVLDLの分離が良好とは言えず、リポ蛋白分画PAG(図4C)ではMIDBANDが検出され、CHO分画(図4D)ではVLDLが分離されなかった。AEX-HPLC(図4A)では、HDL、LDL、IDL、VLDL、Otherの分画が良好に分離された。MIDBANDは複数の異常リポ蛋白が含まれ、その中にはVLDL2(通常のVLDLに比べ比重が高く、コレステロール

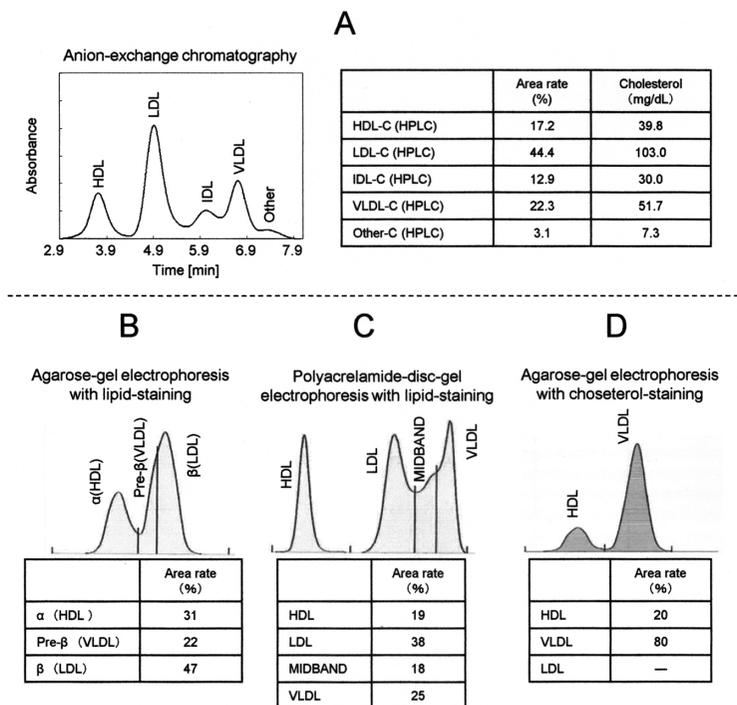


図5 陰イオン交換クロマトグラフィーと3つの電気泳動法との比較（脂質異常症）。
血清の脂質データ：HDL-C = 45 mg/dL、LDL-C = 126 mg/dL、Total-CHO = 227 mg/dL、TG = 276 mg/dL。

含量が多い。)も含まれると推定されている^{17,18)}。

脂質異常症患者の血清について、AEX-HPLC（測定時間5.2 min/test）と既存のリポ蛋白電気泳動（リポ蛋白分画、リポ蛋白分画PAG、CHO分画）と分離パターンについて比較を行った（図5）。健常者の血清での比較（図4）と同様に、リポ蛋白分画（図5B）ではVLDLの分離が良好とは言えず、リポ蛋白分画PAG（図5C）ではMIDBANDが検出され、CHO分画（図5D）ではLDLが分離されなかった。AEX-HPLC（図5A）では、HDL、LDL、IDL、VLDL、Otherの分画が良好に分離された。

CHO分画（Agarose-gel electrophoresis with cholesterol-staining）とAEX-HPLCによるHDL、LDL、VLDLのコレステロール値（mg/dL）の相関性について評価した（図6A）。HDL、LDL、VLDL、それぞれの相関係数は0.98、0.97、0.95と良好な成績を示した。リポ蛋白分画のFat Red 7Bによる脂質染色（Agarose-gel electrophoresis

with lipid-staining）によるHDL、LDL、VLDLの面積比率（%）とAEX-HPLCによるHDL、LDL、VLDLの面積比率（%）の相関性について評価した（図6B）。HDL、LDL、VLDL、それぞれの相関係数は0.84、0.75、0.88と良好な成績を示した。リポ蛋白分画PAGのSudan Black Bによる脂質染色（Polyacrylamide-disc-gel electrophoresis with lipid-staining）によるHDL、LDL、VLDLの面積比率（%）とAEX-HPLCによるHDL、LDL、VLDLの面積比率（%）の相関性について評価した（図6C）。HDL、LDL、VLDL、それぞれの相関係数は0.94、0.82、0.90と良好な成績を示した。

V. まとめ

我々は、陰イオン交換クロマトグラフィーと過塩素酸ナトリウムによるステップワイズ溶出を採用することにより、5.2 minという短時間の

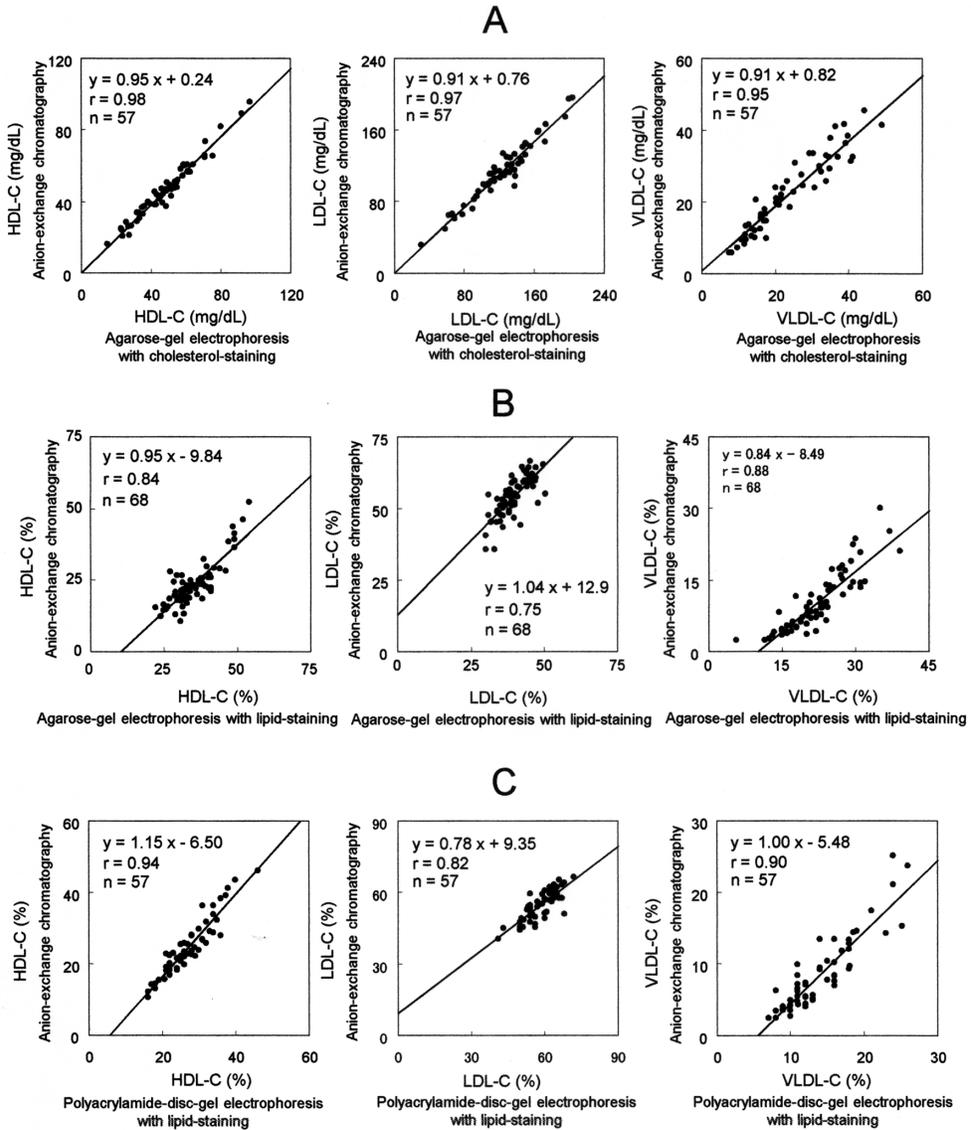


図6 陰イオン交換クロマトグラフィーと3つの電気泳動法との相関図。
 A：コレステロール分画（Agarose-gel electrophoresis with cholesterol-staining）
 B：リポ蛋白分画（Agarose-gel electrophoresis with lipid-staining）
 C：リポ蛋白分画（PAGディスク電気泳動法）（Polyacrylamide-disc-gel electrophoresis with lipid-staining）

中で、HDL、LDL、IDL、VLDL、Otherの5つのリポ蛋白分画の再現性の高い分離を実現した。既存の電気泳動法（リポ蛋白分画、リポ蛋白分画PAG、CHO分画）に比べて分離能力が高く、また、これら電気泳動法との相関性も比較的良好であり、日常の臨床検査として有用である。

イオン交換クロマトグラフィーによるリポ蛋白分析法（AEX-HPLC）は、2011年7月体外診断用医薬品製造販売認証を取得し、2013年7月保険適用〔E3新規項目、リポ蛋白分画（HPLC法）〕となった。精度の高いリポ蛋白分画の検査として、また、HDLとLDLのコレステロール値だけ

でなく、IDLとVLDLのコレステロール値を知ることのできる分析法として、脂質異常症の診断・治療のために幅広く使われるように、継続的に改善・改良を進めたい。

参考文献

- 1) 日本動脈硬化学会: 動脈硬化性疾患予防のための包括的リスク管理. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版, 19-32, 杏林舎, 東京, (2012)
- 2) 日本動脈硬化学会: 脂質異常症の診断基準. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版, 33-36, 杏林舎, 東京, (2012)
- 3) 日本動脈硬化学会: 脂質異常症の診察法. 動脈硬化性疾患予防のための脂質異常治療ガイド2013年版, 18-24, 杏林舎, 東京, (2013)
- 4) Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem*, 179: 973-979, 1949.
- 5) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 34: 1345-1353, 1955.
- 6) Papadopoulos NM: Hyperlipoproteinemia phenotype determination by agarose gel electrophoresis updated. *Clin Chem*, 24: 227-229, 1978.
- 7) Frings CS, Foster LB, Cohen PS: Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel. *Clin Chem*, 17: 111-114, 1971.
- 8) Kida T, Kurata H, Matsumoto A, Tobiyama R, Musha T, Hayashi K, Tamai S, Utsunomiya K, Tajima N, Fidge N, Itakura H, Kondo K: Lipoprotein analysis using agarose gel electrophoresis and differential staining of lipids. *J Atheroscler Thromb*, 8: 7-13, 2001.
- 9) Yoshida H, Hirowatari Y, Kurosawa H, Manita D, Yanai H, Ito K, Tada N: Estimation of lipoprotein profile in patients with type II diabetes and its relevance to remnant lipoprotein cholesterol levels. *Atherosclerosis*, 222: 541-544, 2012.
- 10) Hara I, Okazaki M: High-performance liquid chromatography of serum lipoproteins. *Methods Enzymol*, 129: 57-78, 1986.
- 11) Okazaki M, Usui S, Hosaki S: Analysis of plasma lipoproteins by gel permeation chromatography. *Handbook of Lipoprotein Testing Second Edition*. 647-669, AACC Press, Washington DC, (2000)
- 12) Hirowatari Y, Kurosawa H, Yoshida H, Doumitu KI, Tada N: Analysis method for lipoproteins by high-performance liquid chromatography with sulfopropyl-ligand column and magnesium ion-containing eluents. *Anal Biochem*, 308: 336-342, 2002.
- 13) Hatafi Y, Hanstein WG: Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 62: 1129-1136, 1969.
- 14) Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Doumitu KI, Tada N: Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J Lipid Res*, 44: 1404-1412, 2003.
- 15) Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Shimura Y, Yanai H, Tada N: Analysis of cholesterol levels in lipoprotein(a) with anion-exchange chromatography. *J Lipid Res*, 51: 1237-1243, 2010.
- 16) Ito K, Yoshida H, Yanai H, Kurosawa H, Sato R, Manita D, Hirowatari Y, Tada N: 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.
- 17) 黒沢秀夫, 堂満憲一, 小林正之, 廣渡祐史, 吉田博, 多田紀夫: 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.
- 18) Zhao SP, Bastiaanse EML, Hau MF, Smelt HM, Leuven JAG, Laarse AV, Hoofst FMV: Separation of VLDL subfractions by density gradient ultracentrifugation. *J Lab Clin Med*, 125: 641-649, 1995.