

〈特集：検査技術の新たな展望（3）〉

積水メディカルの分析技術のご紹介 ～脂質の解析を通じて見えてきたもの～

山下 洋平、今井 喜子、森 直美、小笠原 康介、丸野 和哉

Profile of analysis technique by Sekisui Medical Co., Ltd.

Yohei Yamashita, Yoshiko Imai, Naomi Mori, Kosuke Ogasawara and Kazuya Maruno

Summary Hyperlipemia is a major factor in atherosclerosis not only in Europe and the USA but also in Japan. According to the [Outline of the Investigation of health and Nutrition for a Nation in 2006], persons with hyperlipemia over 30 years old are 22.3% in males, and 17.7% in females. Generally speaking, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein are used as sensitive markers of hyperlipemia. In 2012, the guideline of atherosclerosis was revised. LDL-C and non-HDL were set as control points accordingly. Thus, we should measure lipoprotein in serum as accurately as possible for treating patients with hyperlipemia. Sekisui Medical Co., Ltd, provides many kinds of diagnostic reagents for hospitals especially in the lipid field. When our customers are confronted with strange samples, we will analyze the samples and try to discover the cause. We here introduce strange cases, our techniques and the strong points of our diagnostic reagents.

Key words: Hyperlipemia, Analysis technique

I. はじめに

近年、欧米を始め我が国でも、動脈硬化症の原因として脂質異常症が大きな割合を占めています。

厚生労働省が発表した「平成18年国民健康・栄養調査結果の概要」によると、我が国で脂質異常を示す30歳以上の人は男性で22.3%、女性で17.7%と推計されており、30歳以上の20.0%の

人に脂質異常症の疑いがあることとなります。動脈硬化症の惹起物質であるTC、TG、LDL-C、HDL-Cなどの血清リポ蛋白が脂質異常症の管理目標や治療の指標として重要視されていることはご存知の通りです。

また、2012年には動脈硬化性疾患ガイドラインが5年ぶりに改定され、LDL-Cを管理目標とすると同時に、non-HDLが新たな指標として記載されました²⁾。このため脂質異常症の治療・検

積水メディカル株式会社 検査事業部門 検査事業部
カスタマーサポートセンター 分析グループ
〒301-0852 茨城県龍ヶ崎市向陽台3-3-1

Customer Support Center, CS Department, Diagnostics
Business, Sekisui Medical Co., Ltd.
3-3-1 Koyodai, Ryugasaki-shi, Ibaraki 301-0852, Japan

査において血清リポ蛋白をより一層正確に、かつ精密に測定することが喫緊の課題となっています。

積水メディカル株式会社では、1996年販売開始のコレストテストHDLを初めとした液状試薬の「コレストテストシリーズ」として、TC、TG、LDL-C、HDL-C等、脂質関連項目の測定試薬を先生方にお届けしております。これらは汎用の自動分析装置で簡便・迅速に結果が得られるものとしてご使用いただいております。弊社では発売以来品質の安定・向上ならびに技術的な情報のご提供に努めてまいりました(図1)。

弊社カスタマーサポートセンター分析グループでは、医療機関の先生方が遭遇される特殊検体や測定値異常を示す検体について、原因の解析をお手伝いしております。今回は、弊社の分析技術をご紹介しますと共に、特殊検体の解析例や弊社試薬の特長を併せてご紹介致します。

Ⅱ. 積水メディカル カスタマーサポートセンター分析グループの分析技術

当分析グループでは、以下のような手段を通じて、異常値を示す原因物質や特殊なり蛋白



図1 積水メディカル製品について

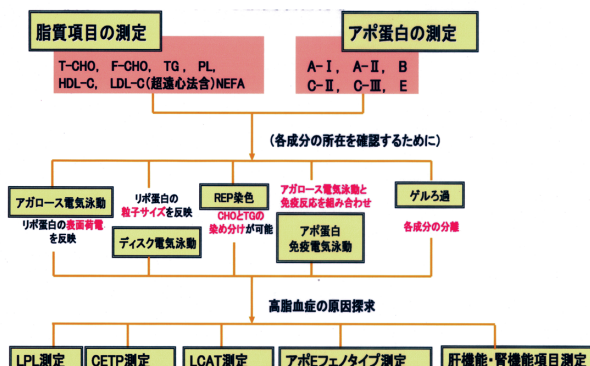


図2 積水メディカルにおける脂質項目分析の手順

表1 各高脂血症型により増加するリポ蛋白

高脂血症型	I	II a	II b	III	IV	V
増加するリポ蛋白	カイロミクロン	LDL	LDL VLDL	IDL	VLDL	VLDL カイロミクロン

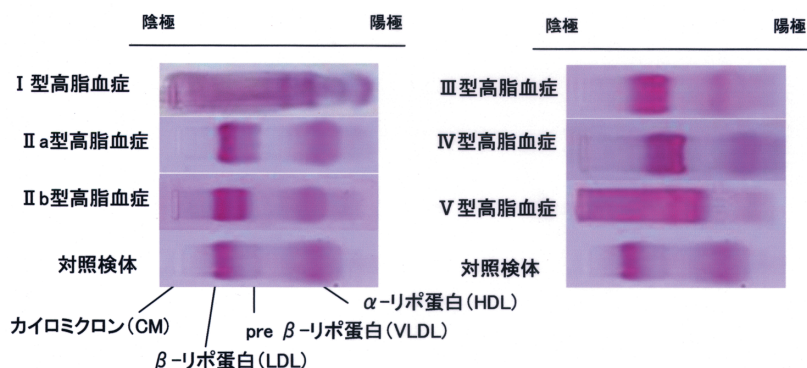


図3 アガロースゲル電気泳動パターン

の分離・同定を行い、その結果から弊社試薬の反応性を元に考察致します。

- 1)自動分析機による再現性、測定タイムコースの確認
- 2)電気泳動によるリポ蛋白の分離・同定
- 3)超遠心法によるリポ蛋白の分画
- 4)ゲルろ過クロマトグラフィーによるリポ蛋白の分画

上記において、2)の電気泳動はアガロース電気泳動、免疫電気泳動法、ディスク電気泳動、REPシステムなど4種類の分析手段を用い多角的にリポ蛋白の状態を把握しております。また、3)の超遠心法はCDCの基準法であるβ-Q法を基に実施します。

このように、脂質の物理・化学的性状に関して弊社が保有する解析手段について一つずつ詳細をご紹介します(図2)。

Ⅲ. アガロースゲル電気泳動 リポ蛋白染色について (図3)

アガロースゲル電気泳動像ではアガロースゲルを支持体として用い、各リポ蛋白の電氣的移動度の違いによってリポ蛋白分画に分離します(図3)。各高脂血症の型により増加するリポ蛋白は異なりますが(表1)、増加したリポ蛋白量に比例して染色程度は濃染されます。また、

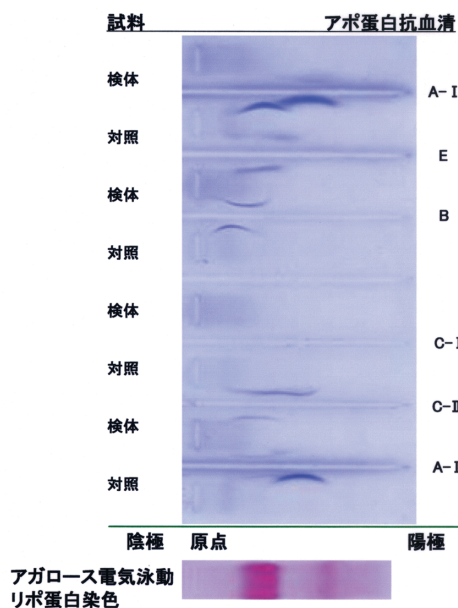


図4 アポ蛋白免疫電気泳動像及びアガロースゲル電気泳動パターン

検体中のNEFAは強い陰性荷電を持っており、アルブミンと結合する他、過剰に存在する場合リポ蛋白にも結合します。高TG検体では多くの場合に高NEFAを伴う為、陽極寄りに泳動される点を考慮し、各バンドについて判断する必要

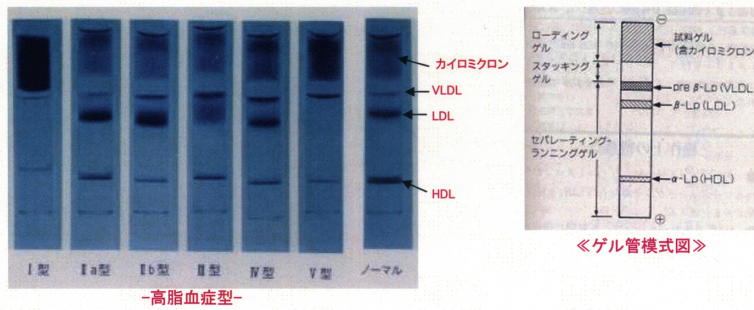


図5 ディスク電気泳動パターン

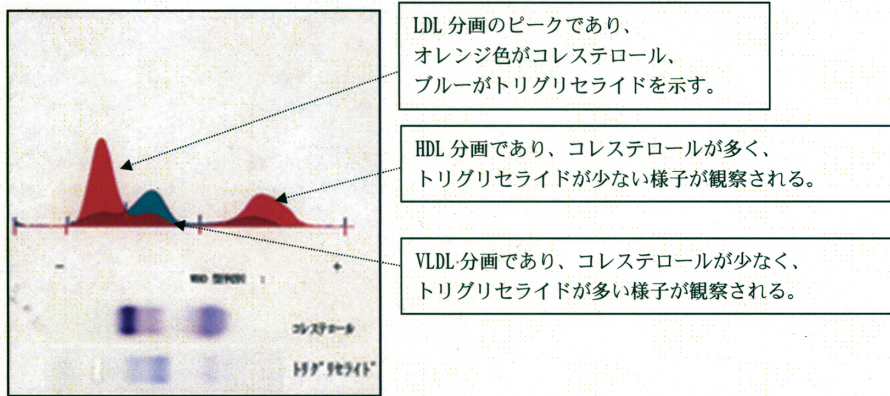


図6 REPデータ解析例

があります³⁾。

IV. アポ蛋白免疫電気泳動について (図4)

アポ蛋白免疫電気泳動では、アガロースゲル電気泳動リポ蛋白染色と照合する事により、アポA-IはHDL (α -リポ蛋白)とVLDL (pre β -リポ蛋白)に、アポBはLDL (β -リポ蛋白)に含まれるなど、リポ蛋白とアポ蛋白の関係性を観察することが可能です。また、一般的なリポ蛋白に含まれるアポ蛋白の関連性を前提として考えることで、通常とは異なるアポ蛋白から構成されるリポ蛋白など、異常リポ蛋白の分析をすることも可能となります。

V. ディスク電気泳動について (図5)

ディスク電気泳動では支持体にポリアクリルアミドゲルを用いている点が特徴であり、主と

してリポ蛋白の粒子サイズにより泳動されます。本電気泳動では特に、VLDLからLDLへの異化の途中で不均一な粒子サイズを呈するIDLがVLDLとLDLの間にミッドバンドとして現れます。F式によるLDL-C算出に際して超遠心法との乖離原因となるIDL⁴⁾を判断し易いという特徴があります。但し、粒子サイズによりリポ蛋白を分画する為、大きなカカロミクロンやVLDLが極端に増加した検体ではポリアクリルアミドゲルが詰まり、HDL等の比較的粒径の小さなリポ蛋白が流れにくくなる点には注意が必要となります。

VI. Rapid ElectroPhoresis (REP) について (図6)

ヘレナ研究所(株)が販売するREP (Rapid Electrophoresis) システムは、全自動にてアガロース電気泳動・コレステロール及びトリグリセ

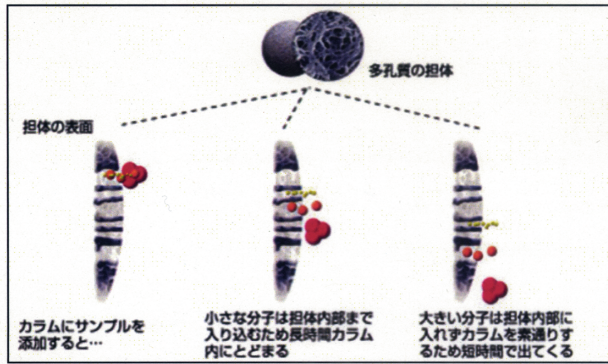


図7 ゲルろ過原理 (GEヘルスケアジャパンより)

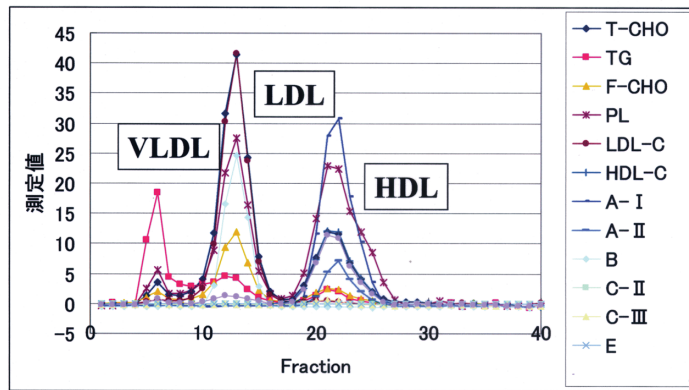


図8 ゲルろ過データ解析例

ライド染色を行い、デンストメトリーを用いて各リポ蛋白分画に含まれるコレステロールとトリグリセライドの含量を知ることが可能です。これにより通常はコレステロール優位なLDLやHDLにどの程度トリグリセライドが含まれるか等、リポ蛋白の性状を分析することが可能です。

VII. ゲルろ過クロマトグラフィーについて (図7)

ゲルろ過クロマトグラフィーは、担体を充填したカラムにサンプルを通すことで分子を大きさの違いによってフラクションに分離する手法です。大きい分子は早くフラクションとして得られる為、リポ蛋白で考えると分子サイズの大きなカイロミクロンは最も早くフラクションとして得られ、VLDL、LDL、HDLの順にフラク

ションが得られることとなります。得られた各フラクションを各試薬で測定することで検体中成分に対する試薬の反応性を分析することが可能です (図8)。

VIII. LDL-C直接法で話題になる特殊検体の解析について

今般、LDL-C直接法において、IV型高脂血症やV型高脂血症等、トリグリセライド (以下、TG) 高値の場合にメーカー間差が見られることや、異常リポ蛋白を含む検体についても測定結果の乖離が見られることが報告されています。弊社ではホームページや分析データを基にした学術資料を通じて、製品の特長や異常リポ蛋白の考え方について情報提供に努めてまいりました。

生物試料分析

表2 (検体①) LDL-C、TG測定値

単位：mg/dL

希釈	コレステストLDL		コレステストTG	
	測定値	換算値	測定値	換算値
原血清	60.9	—	3555.3	—
2倍希釈	39.4	78.8	1950.7	3901.4
4倍希釈	15.9	63.6	1021.3	4085.2
8倍希釈	7.5	60.0	513.1	4104.8

表3 (検体①) その他項目測定値一覧

脂質項目				肝機能項目		蛋白・その他項目	
T-CHO	449	A-I	160	AST	54	TP	6.5
HDL-C	19.6	A-II	40.0	ALT	80	ALB	3.8
F-CHO	223	B	89	γ-GT	1048	GLU	87
NEFA	4377	C-II	18.7	ALP	403	UA	9.9
PL	630	C-III	36.6	T-BIL	0.2	UN	19.0

単位；TP, ABL: g/dL, 酵素項目: IU/L, TBA: μmol/L, NEFA: μEq/L, その他: mg/dL

表4 (検体②) LDL-C、TG測定値

単位：mg/dL

希釈	コレステストLDL		コレステストTG	
	測定値	換算値	測定値	換算値
原血清	80.0	—	1340.0	—
2倍希釈	40.0	80.0	—	—
4倍希釈	19.0	76.0	—	—

表5 (検体②) その他項目測定値一覧

脂質項目		アポ蛋白項目		肝機能項目		その他生化学項目	
HDL-C	25	A-I	163	AST	220	GLU	155
T-CHO	218	A-II	35	ALT	175	UA	7.9
TG	1340	B	98	γ-GT	482	UN	14.3
F-CHO	101	C-II	4.5	ALP	500	CRE	0.9
PL	412	C-III	21.5				
NEFA	5061	E	14.4				
Lp(a)	0.4						

単位；TP, ABL: g/dL, 酵素項目: IU/L, TBA: μmol/L, NEFA: μEq/L, その他: mg/dL

ここではその一環として、当分析グループで遭遇した高TG検体についての症例をご紹介します。

1) TG 1500 mg/dLを超える検体 (検体①)

弊社コレステストLDLをはじめ、国内のLDL-C測定直接法試薬の多くはTG 1500 mg/dL以下での使用を推奨しております。ここではTGが1500 mg/dLを超える検体についての分析結果につい

てご紹介致します。

原血清及び2倍希釈検体ではTGが1500 mg/dLを超えている為(表2)、4倍希釈以降の測定値に着目するとコレステストLDLは概ね60 mg/dL程度に収束しております。

測定タイムコース(図9)を見ると、コレステストLDLは高TGの影響を受けて原血清及び2倍希釈までは初期吸光度が顕著に高く、R2添加まで吸光度が高い様子が観察されます。しかし、

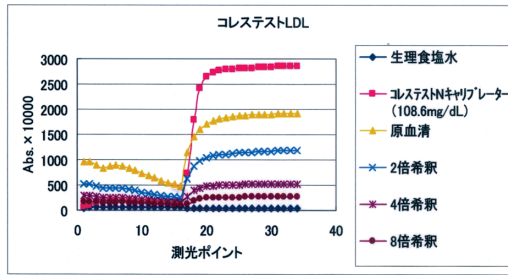


図9 (検体①) コレステストLDL測定タイムコース

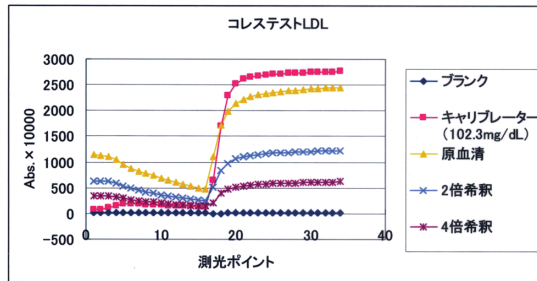


図11 (検体②) コレステストLDL測定タイムコース

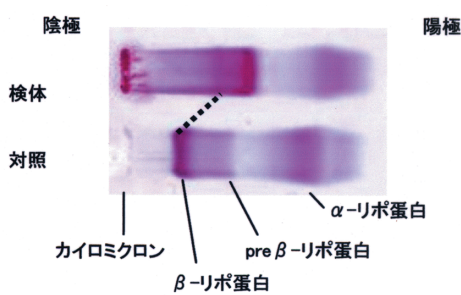


図10 (検体①) アガロースゲル電気泳動結果

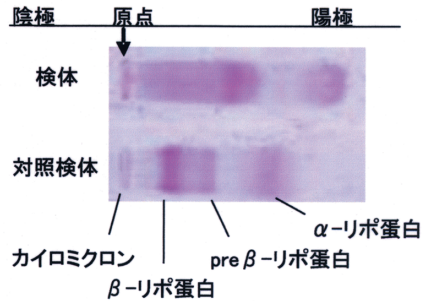


図12 (検体②) アガロースゲル電気泳動結果

TGが1500 mg/dLを下回る4倍希釈以降では概ね高TGによる初期吸光度の高さを解消しており、R2添加後のコレステロール反応による吸光度上昇も正常なパターンを示しております。

アガロースゲル電気泳動像(図10)はNEFA異常高値(4377 μ Eq/L)により全体的に陽極寄りに泳動されておりますが、 β 位のバンドは対照検体(LDL-C:120 mg/dL程度)よりも薄く観察されております。

その他関連項目の測定結果(表3)を見ると全体的に肝機能項目が高値傾向であり、特に γ -GTが高値であること、電気泳動像も踏まえると

アルコール性肝障害に続発してカイロミクロン、VLDLが極端に増加したV型高脂血症検体と考えられます。

電気泳動像から対照検体よりも薄い β 位のバンドが観察されることに加え、TG 1500 mg/dL以下で60 mg/dL程度に収束するコレステストの妥当性は高いと考えられる症例です。

2) TG 1500 mg/dL以下の検体(検体②)

続いて、TG 1500 mg/dL以下の検体に関する分析結果についてご紹介致します。

TGが1500 mg/dL以下であり、一般的な直接法

LDL試薬では測定が可能とされる検体に関する解析症例です。コレステストLDLでは原血清で80.0 mg/dLとなり、希釈回収値は概ね良好な様子が確認されました(表4)。

測定タイムコース(図11)を見ると、コレステストLDLは高TGの影響を受けて原血清及び2倍希釈までは初期吸光度が顕著に高く、R2添加まで吸光度が高い様子が観察されます。しかし、4倍希釈以降では概ね高トリグリセライドによる初期吸光度の高さを解消しており、R2添加後のコレステロール反応による吸光度上昇も正常なパターンを示しております。

アガロースゲル電気泳動像(図12)はNEFA異常高値(5061 μ Eq/L)により全体的に陽極寄りに泳動されておりますが、 β 位のバンドは対照検体(LDL-C: 120 mg/dL程度)よりも薄く観察されております。

その他関連項目の測定結果(表5)を見ると全体的に肝機能項目が高値傾向であり、特に γ -GTやALP、GLUも高値であること、電気泳動像も踏まえるとアルコール性肝障害や糖尿病に続発してカイロミクロン、VLDLが極端に増加したV型高脂血症検体と考えられます。

電気泳動像から対照検体よりも薄い β 位のバンドが観察され、TG 1500 mg/dL以下で希釈測定も含め80 mg/dL程度に収束するコレステストLDLの妥当性は高いと考えられる症例です。

IX. 最後に

一般的にトリグリセライドが400 mg/dLを超える高TG検体ではF式を使用することが出来ず、直接法LDL-C測定試薬においても極端なTG高値検体では負の影響を受けることがあります。その為、弊社コレステストLDLも含め、多くの直

接法LDL-C測定試薬についてはTG実測値が1500 mg/dL以下での測定値を推奨する試薬が多く販売されております。直接法試薬の種類によってはTG 1500 mg/dL以下においても高トリグリセライドの影響を受け、マイナスの値を示す場合がありますが、コレステストLDLは比較的高トリグリセライドの影響を受けにくく、TG 1500 mg/dLを超える検体においても希釈測定により測定が可能です。

もちろん、今回ご紹介したような高トリグリセライド検体におけるLDL-C測定値の妥当性を希釈測定のみで判断することは困難ですが、弊社でのサポート体制においても活用している各種電気泳動像やアポ蛋白の測定値等を総合的に考えることで直接法試薬の妥当性を示すことは可能です。

今後は弊社のサポート技術・体制を更に向上させていくと共に、全国のご施設様自身で高TG検体に関してLDL-C測定値の妥当性を示すことが可能となる方法を模索し、ご提案が出来るよう引き続き検討を続けていく所存でございます。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 平成18年国民健康・栄養調査結果の概要
- 2) 一般社団法人日本動脈硬化学会, 動脈硬化疾患予防ガイドライン2012年度版, 株式会社杏林舎, 2012年
- 3) 芝 紀代子: 目で見える電気泳動法 2 寒天・アガロースゲル, 医歯薬出版株式会社, 1991年
- 4) William T. Friedewald, Robert I. Levy, and Donald S. Fredrickson: Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clin Chem, 18(6): 499-502, 1972.