第71回日本電気泳動学会総会シンポジウム：
生体分子解析の技術革新と生命・医科学研究への応用
論文種目：技術論文

酵素法でコレステロールとトリグリセライドを染色する
全自動リポ蛋白分画法の考案

松下 誠*・山口奈摘美・田中満里奈

埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科

(受付 2021 年 3 月 5 日, 受理 2021 年 6 月 22 日)

SUMMARY

For lipid staining of lipoprotein fractions on electrophoresis, Fat red 7B and Sudan black B are used. These dyes utilize the lipid-soluble characteristic of lipophilic dyes. Accordingly, the value of the fraction may vary due to differences in lipids contained in lipoproteins. We have recently developed a new fully automatic lipoprotein fractionation method, the CH•TG method, which stains total cholesterol (CH) and triglycerides (TG) using enzymes. Compared with the conventional Fat red method, the separation of LDL and VLDL became clearer by the CH•TG method, and full automation was possible. The correlation with the Fat red method was $y=1.04x-9.1$, $r=0.934$ for the HDL fraction, $y=1.27x-6.6$, $r=0.893$ for the VLDL fraction, and $y=1.26x-3.2$, $r=0.734$ for the LDL fraction. In addition, the VLDL and LDL fractions by the CH•TG method better reflected fluctuations in TG and CH, respectively. Based on these results, the CH•TG method may be a new lipoprotein fractionation method that overcomes the problems with the Fat red method.

Key words: lipoprotein fraction, automatic enzymatic method, cholesterol fraction, triglycerides fraction

1. はじめに

脂質およびリポ蛋白検査の中で、コレステロール (CH) やトリグリセライド (TG) を測定する検査は、さまざまな改良が成され現在に至っている。例えば総コレステロール (TC) の測定は、1970 年以前は Abell-Kendall 法¹⁾ を中心とした自動化が困難であった化学法が中心であったが、1973 年にコレステロールオキシダーゼを用いる酵素法^{2,3)} が開発され、それ以降はトリグリセライド (TG) の酵素法⁴⁾ と共に完全に酵素法に置き換わった経緯がある。さらに、1990 年代には、HDL-コレステロール (HDL-C)⁵⁾ および LDL-コレステロール (LDL-C)⁶⁾ の直接法が開発され、現在では TC, HDL-C, LDL-C および TG の 4 項目は、生活習慣病や脂質異常症のスクリーニング検査として完全に臨床検査に定着している。

一方、リポ蛋白分画検査には、アガロースゲル電気泳動法を用いて脂溶性色素 Fat red 7B で染色する方法⁷⁾、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAG) 法を用いて同様に脂溶性色素 Sudan Black B で染色する方法⁸⁾ が使用され、中でも前者の方法は操作が簡便であることから、今日の臨床検査で最も普及している。しかし、これら両者のリポ蛋白分画検査の染色は、対象となる脂質の種類によって染色性が異なる脂溶性色素を用いる方法であり、この脂質染色については、1960 年代から現在に至るまではほとんど改良がなされていない。

また、現在酵素法で脂質を染色する電気泳動法として、CH 分画および TG 分画試薬が開発され、コレトリコンボ (共にヘレナ研究所) として、アガロースゲル電気泳動法を基本とするエパライザ 2 Jr に適応され全自動化されている。そこで、この CH 分画および TG 分画に着目し、両試

Development of a fully automated enzymatic lipoprotein fractionation method for staining total cholesterol and triglycerides
Makoto Matsushita, Natsumi Yamaguchi, Marina Tanaka
Saitama Prefectural University Graduate School

* Corresponding author: Makoto Matsushita; Department of Clinical Chemistry, Saitama Prefectural University Graduate School, 820 Sannomiya, Koshigaya 343-8540, Japan
E-mail: matsushita-m@spu.ac.jp

第71回日本電気泳動学会総会シンポジウム：生体分子解析の技術革新と生命・医科学研究への応用

薬を混合した試薬を調製する CH・TG 法を設定することとした。その結果、この CH-TG 法は、従来のリポ蛋白分画法の問題点を改善し、しかも現在の脂質検査に対応した新たなリポ蛋白分画法と結論づけられた。以下にその内容を紹介する。

2. 従来のリポ蛋白分画法 (Fat red 法) の問題点

現在普及しているアガロースゲル電気泳動法を用いたリポ蛋白分画検査は、大きく 3 つの問題点を有すると考える。1 点目は染色液が用事調製であり、全自動化が困難であること、2 点目はリポ蛋白を構成する脂質の種類によって反応性が異なること、および 3 点目はリポ蛋白分画検査にはその総量に該当する検査がなく独立した検査となっていることである。

まず 1 点目は、現在の自動電気泳動装置エパライザ 2jr (ヘレナ研究所) を用いる Fat red 法では、血清塗布、電気泳動およびデンストメトリが自動化されているが、電気泳動後の染色と脱色は装置からゲルを取り出して用手法で実施する必要がある。そのため、本装置では、蛋白分画検査や酵素のアイソザイム検査は全自動化されているのに対して、リポ蛋白分画検査のみそれが困難となっている。

次に 2 点目は、Fat red 法では、親油性の高いエステル

型コレステロール (EC) や TG が遊離型コレステロール (FC) やリン脂質 (PL) に比べより強く染色される。また、日常検査で測定される TC, HDL-C, および LDL-C などのコレステロール検査では EC はすべて FC に換算された値 (総 FC 値) として測定されているのに対して、Fat red 法では、EC はそのまま染色されている。そのため、TC, HDL-C, および LDL-C 検査と Fat red 法間におけるコレステロール値には整合性が保たれていない。

さらに 3 点目は、臨床検査に普及している電気泳動法の中で、唯一リポ蛋白分画のみが独立した検査となっていることである。例えば、蛋白分画検査には総蛋白, LD, CK, および ALP などの酵素のアイソザイム検査にはそれぞれ総 LD, 総 CK, および総 ALP 検査があり、それぞれの電気泳動検査による割合はそれに該当する総量検査の内訳を示していることになる。しかし、リポ蛋白分画にはその総量に該当する検査はなく、しかも前述したように各脂質検査との整合性もないため、関連検査とを組み合わせた評価が困難となっている。

3. 酵素法 (CH・TG 法) によるリポ蛋白分画法の考案

われわれは、前述したリポ蛋白分画検査の問題点を改善した新たなリポ蛋白分画法を考案することを目的とし、次

Fig. 1 Principle of enzymatic lipoprotein fractionation method for staining total cholesterol and triglycerides

の3点を改良することとした^{9,10}。それは、①全自動化を可能とすること、②PLは測定対象としないこと、③測定対象とする各脂質の分子数に比例した発色が得られる染色法を設定することである。まず、①については、現在の脂溶性色素を用いた染色方法では試薬を工事調製する必要があることやアルコールでの脱色処理が必要であるために、臨床検査の現場に普及している自動電気泳動装置に適応させることが難しい。そこで、自動化を可能とするためには酵素試薬を用いて染色する必要があると考えた。次に、②については、脂質異常症の診断はHDL-C、LDL-CおよびTGの3項目で定義づけられ、PLは用いられていないこと、およびPLは各リポ蛋白中にほぼ均等に存在し、しかも

TCと並行して増減することから、その変動がリポ蛋白分画に反映されにくいことを考慮した。さらに、③については、上記①、②よりEC、FC、およびTGが測定対象となることから、これら3種の脂質1分子あたりの発色を等しくすることで、リポ蛋白分画検査とTC、HDL-C、LDL-Cのコレステロール検査との整合性を保つこととした。

したがって、上述した3点を満たす新たなリポ蛋白分画法として、現在酵素法で染色するCH分画およびTG分画に着目し（共にヘレナ研究所）、両試薬を混合した試薬を調製するCH・TG法を設定することとした。なお、CH・TG法の詳細な分析方法などは既に報告している¹⁰。そして、このCH・TG法は、CHとTGの分子数に比例し

Fig. 2 Comparison of lipoprotein fractionation with the CH•TG method (right) and the Fat red method (left)

た染色となることから (Fig. 1), 分画している脂質が明確となるメリットも有している. それは, EC および FC はすべて FC (分子量 387) として測定しているため, 仮に TG の分子量を 886 (トリオレインの分子量) と考えれば, CH・TG 法では, $TC+TG/2.29$ 量 (2.29 は $886/387$) を, それぞれ, HDL, LDL, VLDL などの各リポ蛋白に分画していることになる. したがって, Fat red 法に比べリポ蛋白として分画している総量を明確にしていることになり, それによって, TC, HDL-C, LDL-C, TG などの各脂質測定値と Friedewald の式とを組み合わせることで, 各リポ蛋白中の TG 量を算出することも可能となる¹¹⁾.

4. Fat red 法と CH・TG 法の比較

脂質異常症患者検体 70 例を対象に, CH・TG 法と従来の Fat red 法を比較検討した. なお, 本検討は残余血清使用の同意および本学倫理委員会の承認 (承認番号 30513) を得て実施している. その結果, CH・TG 法は Fat red 法とは異なり, エパライザ 2Jr を用いる全自動化が可能であった. また, CH・TG 法による各リポ蛋白の分画パターンは, Fat red 法によるそれと類似し, しかも LDL と VLDL 分画のピーク幅が狭く, Fat red 法に比べ両者の分離がより明瞭となった (Fig. 2). また, CH・TG 法 (y) と Fat red 法 (x) による各リポ蛋白分画の相関関係を調べたところ, 両者の相関関係は良好であったが, CH・TG 法では, 全ての例で HDL 分画が低値, 逆に VLDL および LDL 分画が高値となった. 回帰式の傾きは各リポ蛋白で異なり, HDL 分画ではほぼ 1.0 であったのに対して, LDL や VLDL 分画におけるそれらは, それぞれ 1.26, 1.27 と高値となった. そのため, 特に, VLDL 分画では分画値 30% 付近を境に両者の VLDL 分画に逆転現象が認められ, 高 TG 群では CH・TG 法が有意に高値, また低 TG 群では逆に低値となった (Fig. 3). そして, CH・TG 法と Fat red 法における両者の VLDL 分画の差は, TG/TL (総脂質: $TC+TG+PL$) 比が高値になる例ほど CH・TG 法の VLDL 分画が高値, 逆に TG/TL 比が低値になるほど Fat red 法による VLDL 分画が高値となった. このような傾向は, LDL 分画と CH/TL 比についても同様であった^{9,10)}.

これらの結果から, CH・TG 法は Fat red 法に比べ, 脂質異常症の診断基準となる CH や TG の増減をより反映しやすいうり蛋白分画法であると結論づけられた.

5. おわりに

現在, リポ蛋白分画検査は I～V 型に分類される Fredrickson の高リポ蛋白血症の判定に利用されている¹²⁾. また, 現在普及しているリポ蛋白分画検査は, 1960 年代に開発されたものであり, LDL-C や HDL-C が直接測定可能となった現代においても大きな改良がなされていない.

Fig. 3 Correlation between HDL, LDL and VLDL fraction of Fat red method and CH・TG method

このような背景を考慮すると, CH・TG 法は全自動化も可能であり, 現在の脂質検査により適応しているリポ蛋白分画と考えられる.

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い.

文 献

- 1) Abell LL, Levy BB, Broddie BB, *et al.* A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem.* 1952;195:357-366.
- 2) Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem.* 1973;19:1350-1356.
- 3) Allain CC, Poon LS, Chan CS, *et al.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20:470-475.
- 4) Eggstein M, Kreutz FH. A new determination of the neutral

- fats in blood serum and tissue. I. Principles, procedure, and discussion of the method. *Klin Wschr.* 1966;44:262–267.
- 5) Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, *et al.* Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated α -Cyclodextrin. *Clin Chem.* 1995;41:717–723.
 - 6) Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, *et al.* Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α -cyclodextrin sulfate. *Clin Chem.* 1998;44:522–531.
 - 7) Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 1968;9:693–700.
 - 8) 浦田武義. 電気泳動法によるリポ蛋白分画法. 臨床検査. 1985;29:1344–1532.
 - 9) 山口奈摘美, 田中満里奈, 松下 誠ら. 酵素法でコレステロールとトリグリセライドを染色する全自動リポ蛋白分画の開発. 臨床化学. 2020;49:124–126.
 - 10) 山口奈摘美, 巖崎達矢, 松下 誠ら. 酵素法でコレステロールとトリグリセライドの和を染色する全自動リポ蛋白分画法の開発. 医療検査と自動化. 2020;45:544–550.
 - 11) 志村彩夏, 山口奈摘美, 松下 誠ら. 酵素法による全自動リポ蛋白分画と脂質検査とを組み合わせたリポ蛋白中TG量の簡易測定. 日本臨床検査自動化学会会誌. 2019;44:474.
 - 12) 内藤周幸. 高脂（質）血症および高リポ蛋白血症の概念と分類—Fredrickson分類とWHO分類を中心に—. 日本臨床. 1975;33:3139–3146.