論文特集「分子認識とその応用」

(日本化学会誌, 1987, (3), p. 524~530)

© 1987 The Chemical Society of Japan

ヒト血中リポタンパクサブフラクションのコレステロール
分布測定用バイオリアクターシステム

(1986年8月13日受理)

牧野圭祐*・佐々木一郎・上西 徹
武内民男・原 一郎**・海野益郎**

本研究は心筋梗塞に密接に関連する血中リポタンパクサブフラクション中のコレステロールエステル含有量を測定するための自動臨床分析法の開発に関するものである。具体的には、リポタンパク中のコレステロールエステルに反応し、最終的に過酸化水素を生じるコレステロールエステルヒドラーゼ (CEH) およびコレステロールオキシダーゼ (COD) を、リポタンパクと相互作用のない排除クロマトグラフィー用ゲルに固定化し、これをバイオリアクター型検出器として、リポタンパク分離用の排除クロマトグラフィー用カラム後方に接続した。CEH および COD はグルタルアルデヒドをスパーサーとして用いることで固定化できた。このシステムで生成した過酸化水素をオンラインで発色することで、550 nm に吸収極大をもつキノンジイミン色素を生成し、これをモニターしたところ、低密度および高密度リポタンパクに由来するピークを得た。この溶出挙動は、過去に報告された CEH および COD を水溶液発色剤として消費する方法によって得られた結果とよい相関をみた。またピークの溶出容量、理論段相当高、面積を詳細に検討したところ、これらが本研究の目的である高脂血症の型の認識を可能にすることを見いだした。以上のように本研究は、今日の最大死因の一つである心筋梗塞を予知し、また治療経過をモニターするのに大きな可能性をもつ方法を提供するものである。さらに本研究で得たバイオリアクター型検出器は血中リポタンパクを選択的に(特異的に)検出するものであり、「分子認識とその応用」という今回の課題に適合するものであると考える。

1 緒 言

酵素は、生体成分の一つを巧妙に認識し、これと特異的に反応する。よって、複雑な混合物中の特定の微量成分の検出に優れる。このような理由から、酵素は臨床化学分析では微量分析試薬として長い歴史をもつ^{1)~4)}。また長年にわたる個々の酵素の特性に関する研究の結果、詳細な取りあつかい方法が明らかにされており、このため今日、酵素は臨床化学分析で広範に使用される。臨床化学分析においては、連続して供給される試料に対応するため多量の酵素が必要とされるが、今日これは微生物発酵により十分に供給される。しかしながら、酵素の価格は依然として高く、

現代医学を支える臨床化学分析に関するコストの引き下げは、いまなお重要な研究課題である。以上の問題解決のため、固定化酵素法の臨床化学分析への導入が行なわれた⁵⁾。この方法のもっとも有利な点は、酵素を水に溶解しない支持体に固定することで、その再利用が可能になることである。さらには、固定化することにより酵素本来の至適温度あるいは至適 pH を変化させることができたり、使用時の安定性が増すなど、酵素活性を利用するために有利な条件が発現することがある。また、酵素を固定化して用いる場合、カラムに充填するなどの操作も可能であり、これを流路系に組み込むことができる。

固定化酵素を自動臨床化学分析に応用したシステムは、二つのタイプに分類できる。一つは、血中グルコースなどの測定⁶⁾に代表されるように、目的成分の総量を求める場合であり、このような場合に固定化酵素はオートアナライザーやフローインジェクション

京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科, 606 京都市左京区松ヶ崎

** 東洋曹達工業株式会社科学計測事業部, 252 綾瀬市早川

1) E. K. Jr. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 15, 487(1913).

2) E. Praetorius, H. Poulsen, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5, 273(1953).

3) W. Richmond, *Clin. Chem.*, 19, 1350(1973).

4) C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, C. Fu, *ibid.*, 20, 470(1974).

5) N. Grubhofer, L. Schleith, *Naturwissenschaften*, 40, 508(1953).

6) T. Murachi, Y. Sakaguchi, M. Tabata, M. Sugahara, J. Endo, *Biochimie*, 62, 581(1980).

の流路系に組み込まれる⁷⁾⁸⁾。ほかには、胆汁酸などのアイソザイムの相対量を求める場合であり、同様に固定化酵素は流路系に組み込まれるが、この場合、定量前に目的成分を分離する操作が必要である⁹⁾。このような測定は、前者にくらべ、個々の成分の正確な量が決定できることおよびそのパターン分析が可能という点で優れている。

本研究においては、上に述べた第二の方法の応用として、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患と関係の深い高脂血症を検出することを目的として、ヒト血中リポタンパクの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離と、固定化酵素カラムを具備したバイオリアクター型検出システムを組み合わせた自動分析システムの開発を行なった。とくに、すでに報告されたように¹⁰⁾、上記の疾患はリポタンパクサブフラクションの代謝異常による高コレステロール含有リポタンパクサブフラクションの蓄積に起因するので、本研究では、コレステロールをモニターとしたシステムについての検討を行なった。また得られた結果は、過去に報告された酵素溶液を発色剤とする方法^{11)~13)}によって得られた結果と比較した。

2 実 験

試料として用いたヒト血清は、12~16時間のfasting後の健康人あるいは高脂血症患者から得た。コレステロールエステルヒドラーゼ (EC 3.1.1.13 *Pseudomonas fluorescens* 由来) (以下 CEH と略記する) およびコレステロールオキシダーゼ (EC 1.1.3.6 *Brevibacterium sterolium* 由来) (以下 COD と略記する) は協和メデックスから供給された。西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.7) (以下 POD と略記する) はバーリンガー・マンハイム山之内から購入したものを用いた。CEH および COD の固定化支持体として用いた排除クロマトグラフィー用ゲル G 6000 PW は東洋曹達工業から得た。G 6000 PW はトシル化を行なったのち、プロピレンジアミンと反応させアミノ化して用いた。発色反応に用いる 4-アミノアンチピリン (以下 4-AA と略記する)、*N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-*m*-トルイジン (以下 TOOS と略記する) は同仁化学研究所から購入し、ポリオキシエチレン-(10)-オクチルフェニルエーテル (商品名 Triton X-100) は和光純薬工業から購入した。なお、Triton X-100 は、購入した中に、POD、4-AA、TOOS 存在下で発色するものがあり (550 nm)、あらかじめ発色反応を行わない Triton X-100 を用いた場合も水中に添加したのち、室温で放置するうちに発色を行なうものがあったため、冷所保存して用いた。ここで、Triton X-100 は、水溶液とリポタンパクとの親和性を増

すために添加した⁹⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。この作用は、生体中では、たとえば胆汁酸が行なっている。ほかの試薬は半井化学から購入したものをを用いた。使用した水は Milli R/Q 純水装置 (Millipore, Bedford, MA, USA) で精製した。

CEH および COD の G 6000 PW への固定化は以下の方法で行なった。アミノ化した G 6000 PW (0.5 cm³, 湿潤状態) を 2.5% グルタルアルデヒド水溶液 (10 cm³) 中で活性化した^{16)~21)}。反応は、ゲル中の気泡を除去するため、最初の 30 分間は室温減圧下で行ない、その後 1.5 時間室温大気圧下で放置して行なった。活性化したゲルをデカンテーションで水洗したのち、これに 2 mmol・dm⁻³ エチレンジアミン四酢酸 (以下 EDTA と略記する) を含む 150 mmol・dm⁻³ リン酸塩緩衝液 (3 cm³) に溶解した CEH (0.6 mg, 62 unit) と COD (9.4 mg, 119 unit) を加えて、室温減圧下で 30 分間気泡を除去しながら反応を行ない、その後 5°C で 1.5 時間反応を継続した。この後未反応の両酵素を水でデカンテーションして除去した。得られた固定化酵素は湿潤状態で 5°C で保存した。ウシ血清アルブミンを検量線作成の標準物質として用い、280 nm の吸収から計算した固定化酵素のタンパク含有量は湿潤ゲル 1 cm³ あたり 5.4 mg であった。

得られた固定化酵素の活性測定は、一定量の固定化酵素 (10 mg, 乾燥状態) を 150 mmol・dm⁻³ リン酸塩緩衝液 (2 cm³) に加えヒト血清 (0.2 cm³) を加えたのち、40°C でかきまぜながら放置し、1 分後 0.5 mmol・dm⁻³ 4-AA、0.3 mmol・dm⁻³ TOOS、6.7 unit/mg POD を加え着色量を 550 nm で測定することにより行なった。

3 結果と考察

リポタンパクはタンパク、脂質、コレステロールエステルなどの複合体であり、カイロミクロン、超低密度リポタンパク (VLDL)、低密度リポタンパク (LDL)、高密度リポタンパク (HDL) などが存在する。すでに報告されているこれらの分離法は、電気泳動法²²⁾、沈降法²³⁾、超遠心法²⁴⁾などであるが、これらは自動分析法には適しない。また血清中での形状をたもちながらこれらを分離する HPLC のモードはかぎられる。たとえば有機

- 7) J. Endo, M. Tabata, T. Murachi, *Clin. Chim. Acta*, **95**, 411(1979).
- 8) 田畑勝好, 福永千桂子, 木戸隆宏, 村地 孝, 日本臨床検査自動化学会誌, **8**, 801(1983).
- 9) S. Okuyama, N. Kokubun, S. Higashidate, D. Uemura, Y. Hirata, *Chem. Lett.*, **1979**, 1443.
- 10) M. S. Brown, P. T. Kovanen, J. L. Goldstein, *Science*, **212**, 628(1981).
- 11) I. Hara, M. Okazaki, Y. Ohno, *J. Biochem.*, **87**, 1863(1980).
- 12) M. Okazaki, Y. Ohno, I. Hara, *ibid.*, **89**, 879(1981).
- 13) M. Okazaki, K. Shiraishi, Y. Ohno, I. Hara, *J. Chromatogr.*, **223**, 285(1981).

- 14) Y. Uwajima, O. Terada, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1957(1976).
- 15) A. Noma, K. Nakayama, *Clin. Chim. Acta*, **73**, 487(1976).
- 16) M. Tabata, J. Endo, T. Murachi, *J. Appl. Biochem.*, **3**, 84(1981).
- 17) I. Sasaki, K. Makino, T. Takeuchi, H. Sasaki, *J. Chromatogr.*, **332**, 237(1985).
- 18) F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **52**, 833(1964).
- 19) A. F. S. A. Habeeb, *Arch. Bio. Biophys.*, **119**, 264(1967).
- 20) P. D. Weston, S. Avrameas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1574(1971).
- 21) H. H. Weetall, L. S. Hersch, *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 464(1969).
- 22) S. Raymond, J. L. Miles, J. C. J. Lee, *Science*, **151**, 346(1966).
- 23) M. Burnstein, H. R. Scholnick, R. Morfin, *J. Lipid Res.*, **11**, 583(1970).
- 24) 八杉忠男, 佐々英一, 木下 毅, 桑原慎次, 最新医学, **27**, 424(1972).

Fig. 1 Flow diagram of the cholesterol ester distribution determination system

溶媒を用いる逆相クロマトグラフィーでは形状の破損が生じ、イオン交換法ではリポタンパクサブフラクションの異なりを認識できない。血中リポタンパクは、サブフラクションごとに粒子径が異なるので、これを分離するには生体試料との相互作用が小さく分子量の異なりによって分離を行なう排除クロマトグラフィーが有効と考えられるが、過去に TSK-PW および SW シリーズのカラムを組み合わせて用いたとき、優れた結果が得られたと報告されている⁽¹¹⁾⁻⁽¹³⁾。よって今回の研究では、G 5000 PW 単独あるいは G 5000 PW + G 3000 SW の組み合わせを用いた。図 1 にこのカラム列を組み込んだ本研究で用いた装置の概略を示す。図中示されたように分離用カラムの出口には固定化酵素カラムを接続し、この入口部には第二ポンプから送液される発色液を導き、分離されたリポタンパクサブフラクションの固定化酵素上での反応で生成する過酸化水素を発色剤と反応させた。これらの一連の反応をつぎに示す。

よって反応最終液（溶離液）はリポタンパクサブフラクションの分布およびそれらに含まれるコレステロール量に比例した着色を行っており、この吸光度を測定することで本研究の目的は達成できる。すなわち、検出は着色反応生成物の最大吸収波長であり、ほかの血中タンパクの妨害を受けない 550 nm で行なった。

つぎに、上記のシステムについての個々の部分の検討結果を示

Fig. 2 Change in the activity of the immobilized enzyme during the storage

Storage conditions: wet (○), dry (●)

Temperature: 5°C, Sample: Normal human serum

す。まず固定化酵素カラム調製法について検討を行なった。実験で記述した方法で調製した固定化酵素の活性は、5°C で保存では、1 か月以上変化しなかった。一方、乾燥状態で 5°C で保存した場合には 1 か月で 40% の活性低下がみられた（図 2）。湿潤状態で安定であるという特徴は、固定化酵素を流路系に組み込んで用いることを考えたとき好ましい結果である。また、過去の報告では両酵素を含むキット（Determiner TC-555）を POD, TOOS および 4-AA などの発色剤とともに水溶液として用いるが、この場合、調製した液は一週間以内に使用しなければならず、固定化酵素を用いる方法がより優れた結果を示した。固定化酵素を水中に分散させたステンレススチール製充填用リザーバーにとり、これに接続したステンレススチール製カラムに充填したところ、得られた固定化酵素カラムは活性を示さなかった。さらに充填した固定化酵素をカラム外に取りだし、これに血清ならびに発色剤を加えて温置しても活性は得られなかった。すなわち、本研究で用いた固定化酵素はステンレススチール部分との接触によって容易に失活することがわかったので、ガラス製リザーバーを用いてガラス製耐圧カラム（内径 2 mm, 長さ 5 cm）に充填して用いた。このガラス製カラムを図 1 に示したシステムに組み込み、ヒト血清を注入したところ、このときもピークの発現はなかった。しかしながら、このシステムからステンレススチール製分離用カラムを除去し、ガラス製固定化酵素カラムのみを具備した系にヒト血清を注入したところ、1 本の鋭いピークを検出した。よってシステム中のステンレススチール表面の存在が固定化酵素の活性発現に対する障害を行なうと解釈し、ステンレススチール製カラムから耐圧ガラス製 G 5000 PW カラム（内径 8 mm, 長さ 30 cm）を用いたところ、図 3 に示すようなピークの発現をみた。なお図中には、280 nm で検出した血中タンパクの分離パターンも示した。これはリポタンパクの分離パターン認識は行なわれないが、今回使用した 2 種類の分離用カラム系でカラム劣化のモニターとして有効であった。しかしながら図中で示されたように、得られた 550 nm で検出したクロマトグラム中にはヒト血清の粘性によると考えられる鋭いディップが現われ、ピークの位置および定量性に問題を残した。このディップ発現は、種々の市販の簡易型 HPLC 用ポンプ（たとえばミルトンロイ社製 5 SK 25 GK-A 型）を用いても

Fig. 3 Elution profile of normal human serum obtained by the immobilized enzyme method with a poorly controlled pump

The solid and dot lines were obtained by monitoring at 550 nm and 280 nm, respectively

Conditions; Pump; 5 SK 25 GK-A, Column; G 5000 PW, Sample; Human serum (cholesterol content being 2.32 g/dm^3), Sample volume; $2 \times 10^{-2} \text{ cm}^3$, Main path eluent; $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ phosphate buffer (pH 7.0) containing $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA, Flow rate of main path; $0.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, Staining eluent; $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ phosphate buffer (pH 7.0) containing $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4-AA, $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TOOS, 6.7 unit cm^{-3} POD, 1% Triton X-100 and $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA, Flow rate of staining path; $0.25 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, Temperature; 40°C

除去することができなかったが、コンピューターにより微小の流速 ($1 \times 10^{-8} \text{ cm}^3/\text{min}$) を制御できるポンプ (CCPM, 東洋曹達工業製) を用いたところ、消去できた。なお、ステンレス鋼製分離用カラムをもったシステムでピーク発現がなかったのは、酸素通気を十分行なった溶離液を用いたとき、ステンレス鋼製分離用カラムを用いたときでもガラス製カラムを用いたときとまったく等強度のピークの発現をみたことから、ステンレス鋼表面での溶離液中の酸素消費が生じ、この結果、COD 活性が発現できなかったのであろうと考えられる。さらに、ガラス製分離用カラムを装着した系で、水流アスピレーターを用いて十分脱気を行なった溶離液を用いてヒト血清を測定したところ、この場合も上とまったく同様のピーク発現をみた。すなわち、ステンレス鋼表面をもたないシステムを用いた場合には、通常的水流アスピレーターによる溶離液脱気では除去されずに溶存している酸素量で COD は十分に活性を発現できると考える。またこのような脱気した溶離液を用いることが可能であることは、HPLC ラインでの気泡発生を防ぐことができるという意味でも有利である。

以上の結果をふまえ、以下の実験には、ポリマーをコートした CCPM ポンプおよびインジェクター、耐圧ガラス製分離用 (G 5000 PW + G 3000 SW, とともに内径 8 mm, 長さ 30 cm) および固定化酵素カラム (内径 8 mm, 長さ 10 cm), テフロン製チューブ、

ポリプロピレン製ジョイントを用いた。なお、固定化酵素カラムと検出器の間に位置する反応コイルは背圧および反応時間を考慮して、内径 0.4 mm, 長さ 10 m のものを用いた。なお、この場合、第一ポンプおよび第二ポンプからの送液量が $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ の場合、通過時間は約 1.2 分であった。

つぎに溶離液および発色剤の選択を行なった。溶離液は以下の理由を考慮に入れ、pH 7 のリン酸塩緩衝液を用いた。1) SW カラムはシリカを基材としており、このため使用できる溶離液の pH は 7.5 以下に制限される。2) CEH および COD の至適 pH は 7~8 であるが、POD のそれは 6 であり、3 種類の酵素の活性を有効に発現させるためには pH 7 付近の溶離液が好ましい。3) 日本人の血液の平均的 pH は 7.35~7.45 であり、pH 7 付近の pH ではリポタンパク形状の変化が起こりにくいと考えられる。また、同緩衝液の濃度は、 $300 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ では試料の吸着によるピーク広がりが見られたため、ピーク広がりを生じない 150

Fig. 4 Elution profile of normal human serum obtained by the method using CEH and COD immobilized (a) and in solution (b)

The solid and dot lines were obtained by monitoring at 550 nm and 280 nm, respectively

Conditions; Pump; CCPM, Column; G 5000 PW + G 3000 SW, Sample; 10 times diluted human serum (cholesterol content being 2.32 g/dm^3), Sample volume; 0.1 cm^3 , Main path eluent; (a) Same as in Fig. 3 and (b) $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris buffer (pH 7.0), Flow rate of main path, $0.2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, Staining eluent; (a) Same as in Fig. 3 and (b) Determiner TC-555, Flow rate of staining path; $0.08 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Other conditions same as in Fig. 3

Fig. 5 Elution profile of sera of hyperlipidemia patients obtained by the immobilized CEH and COD method. The difference in the line shows the difference in the source

Sample ; 10 times diluted serum of hyperlipidemia patient

Other conditions same as in Fig. 4 (a)

$\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ を選択した。また第二ポンプで送液される発色液は、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4-AA, $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TOOS, 6.7 unit/cm^3 POD および 1% Triton X-100 を含むものを用いた。以上決定したシステムを用い、健康人血清および高脂血症患者血清の測定を行なった。測定は、採取した血清を 10 倍に希釈したものを 0.1 cm^3 注入して行なった。また第一ポンプおよび第二ポンプからの送液量はそれぞれ $0.2, 0.08 \text{ cm}^3/\text{min}$ であり、このとき反応コイル内の溶離液通過時間は約 4 分であった。また測定温度は室温であり、固定化酵素カラム温度は 40°C であった。ここで高脂血症は先天性と後天性のものがあるが、Frederickson の分類によれば、先天性のものは六つのタイプに分かれる²⁵⁾。この中で動脈硬化—心筋梗塞と関係の深いのは家族性高脂血症 (II a 型など) および III 型で、II a 型では血中の LDL 濃度が増加し、III 型では VLDL 濃度が増加する。健康人および 2 人の高脂血症患者血清から得られた測定結果 (クロマトグラム) をそれぞれ図 4-a および図 5-a および b に示した。また比較のため、前に報告された酵素キットを発色剤として用いる方法^{11)~13)} で得られた結果を図 4-b ならびに図 6-a および b に示した。図中、ピーク 1 は主として LDL に、ピーク 2 は HDL に由来することを、超遠心法で分離して得た LDL および HDL を用いて確認した。ここで、図 4 に示した健康人および図 5 および図 6 に示した高脂血症患者から得られたクロマトグラムのピーク部分を切り抜き総重量を測定し、二つの方法で得られた値をプロットしたところ、両者にはよ

25) D. S. Frederickson, R. I. Levy, R. S. Lees, *New Engl. J. Med.*, 276, 34, 94, 148, 215, 273(1967).

Fig. 6 Elution profile of sera of hyperlipidemia patients obtained by the method using CEH and COD in solution

The difference in the line shows the difference in the source

The line same as that in Fig. 5 shows the sample obtained from the same source

Sample ; 10 times diluted serum of hyperlipidemia patient

Other conditions same as in Fig. 4 (b)

Fig. 7 Plots of the peak area (A) obtained by the immobilized CEH and COD method, against that (B) by the method using the enzymes in solution (○), and against the total cholesterol of the samples (●)

Table 1 Chromatographic parameters for the peaks obtained by the immobilized CEH and COD method

Sample serum	Elution volume (cm ³)		Theoretical plate number (per 60 cm)		Peak height of LDL (peak 1)
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	(Relative value)
Normal	22.2	28.3	1530	—	1
Hyperlipidemia 1	21.6	28.3	706	—	1.48
Hyperlipidemia 2	22.2	28.3	1510	—	2.49

い相関がみられた(図7)。また酵素キットを用いて三つの血清から求めた総コレステロール値を本研究の方法で求めた総ピーク重量とプロットしたところ、これも良好な関係が得られた(図7)。すなわち、本研究で用いたバイオリアクター型検出器を具備した臨床分析システムを用いた場合、得られる結果は酵素キットを発色剤とする高コストのシステムで得られる結果と一致し、さらには得られるピーク面積の測定により血清中の総コレステロールも求めることができる。またクロマトグラム上のピーク形状に着目し、図5-aおよびbのそれを図4-aの健常人に対するピーク形状と比較した。表1に、各ピークの溶出容量、理論段数、ピーク高相対値(健常人を1として)をまとめたが、患者1の血清ではほかの二つにくらべてピーク1の溶出容量が小さく、またピーク幅が広く、これは本研究のカラム系では分離して観察することはできなかったが、VLDLのLDLピークへの重なりによるものと考えられ、Ⅲ型高脂血症の可能性が高い。一方、2の試料で

はピーク1の溶出容量およびピーク幅は健常人のそれと同等であるがLDLのピーク高がきわめて高く得られた。すなわち患者2はLDL量の多いⅡa型高脂血症であると考えられる。

以上示したように、本研究において開発された固定化酵素を充填したバイオリアクターを検出部にもつシステムを用いた場合、高脂血症患者の血清を健常人のそれと識別することが可能であった。さらに得られたクロマトグラムのパターン分析により、表現型で表した高脂血症の分類型も認識できることがわかった。また、これらの結果は前に報告された酵素キット溶液を分離後のラインに添加する方法で得られた結果とよい相関を示した。健常人血清を用いた測定は、同一システムで、30回くり返し行なわれたがピークパターンおよび各ピーク高は、その間不変であった。

この研究は、文部省科学研究費補助金(特定研究「高性能化学センサ(課題番号、61127003)」)の援助を受けたものである。

Special Articles on Molecular Recognition and Its Application

A Bioreactor System for the Determination of Cholesterol Distribution in Separated Human Serum Lipoprotein Classes

Keisuke MAKINO*, Ichiro SASAKI, Tohru UENISHI, Tamio TAKEUCHI,
Ichiro HARA** and Masuo UMINO**

*Department of Polymer Science and Engineering, Faculty of Textile Science, Kyoto
Institute of Technology; Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan*

*** Scientific Instrument Division, Toyo Soda Manufacturing Co. Ltd.; Hayakawa,
Ayase-shi 252 Japan*

In order to determine cholesterol distribution in human serum lipoprotein classes, which has been known to be directly related to heart-attack diseases, a bioreactor-type detection system consisting of cholesterol ester hydrolase (CEH) and cholesterol oxidase (COD) immobilized on size-exclusion chromatographic gel (TSKgel G 6000 PW) was combined with size-exclusion chromatographic separation of the lipoproteins. Glass separation columns packed with G 5000 PW and G 3000 SW were found to be suitable for the separation. CEH and COD were coimmobilized on the gel activated with glutaraldehyde and packed into a glass column, which was connected to the exit of the separation column array. To the inlet of the enzyme column, introduced was staining fluid composed of peroxidase, 4-aminoantipyrine, *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine, and Triton X-100. In this system, cholesterol ester in the lipoproteins could be converted into cholestenone and subsequently thus released H₂O₂ could be stained in a Teflon reaction coil attached to the exit of the column. Upon using a polymer-coated pump, precisely controlled by the computer, and polymer parts to avoid stainless steel surface in the system, the peaks due to low density and high-density lipoproteins appeared in the chromatogram. The elution

profile of the peaks was in good agreement with that obtained by the method reported previously in which a large amount of CEH and COD were consumed as staining reagents. From the elution volumes, the height equivalent to a theoretical plate number, and the peak area of the peaks obtained, types of hyperlipidemia could be recognized.