

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4058828号  
(P4058828)

(45) 発行日 平成20年3月12日(2008.3.12)

(24) 登録日 平成19年12月28日(2007.12.28)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 30/78	(2006.01)	GO 1 N 30/78	
GO 1 N 30/84	(2006.01)	GO 1 N 30/84	A
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	J

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平11-16779	(73) 特許権者	000003300
(22) 出願日	平成11年1月26日(1999.1.26)		東ソー株式会社
(65) 公開番号	特開2000-214150(P2000-214150A)		山口県周南市開成町4560番地
(43) 公開日	平成12年8月4日(2000.8.4)	(72) 発明者	広渡 祐史
審査請求日	平成17年12月6日(2005.12.6)		神奈川県相模原市相模大野7-37-17 -404
		審査官	河野 隆一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポ蛋白質の分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のリポ蛋白質を分析する液体クロマトグラフィー装置であって、単一流路を用いて試料を分離カラムに導入し、分離カラムからの溶出成分をn(nは2又は3である)分割してそれぞれが検出器を備えるn本の流路に導き、各流路に導かれた成分に対してコレステロール反応試薬、トリグリセリド(中性脂肪)反応試薬又はリン脂質反応試薬の中から選ばれるn種の反応試薬のうち、流路ごとにどれか1つを選択した上で混合、反応させた後、各流路ごとに検出器を用いてリポ蛋白質の検出・測定を行うようにした液体クロマトグラフィー装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】

本発明は、血清、血漿、細胞培養上清などの試料中に含まれるリポ蛋白質を分析するための装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

リポ蛋白質は、コレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)、リン脂質及びアポ蛋白質が会合した物質で、時としてビタミンE等も会合している複雑な複合体である。リポ蛋白質は、その粒径や含有されるアポ蛋白質の種類に基づき、カイロミクロン(以下「CM」と記載する)、超低比重リポ蛋白質(以下「VLDL」と記載する)、低比重リポ蛋白質

(以下「LDL」と記載する)、高比重リポ蛋白質(以下「HDL」と記載する)等に分類される。そして、例えばヒト血液試料中のCM、VLDL、LDL等に含まれるコレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)及びリン脂質の含有量について量比を分析することが、虚血性心疾患、肝疾患、糖尿病等の疾病と脂質代謝異常との関連を解明する上で重要になっている。

#### 【0003】

CM、VLDL、LDL等の量比を分析するためには、血液試料等をゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー又は逆相クロマトグラフィー等の液体クロマトグラフに供してリポ蛋白質を粒径、電荷又は疎水性等に基づきCM、VLDL及びLDL等に分離した後、各分離画分中のコレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)又はリン脂質等を検出・測定して分析するという、簡便で再現性の良い液体クロマトグラフ法を用いるのが一般的である。液体クロマトグラフ法では、分離カラムによる分離の後に、コレステロール、リン脂質又はトリグリセリドと反応する反応試薬を混合し、反応コイルで反応させてから検出器で検出・測定してクロマトグラムを得、このクロマトグラムから分析を行う。

10

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

前記の通り、現在のところでは、液体クロマトグラフ法を用いて液試料中に含まれるCM、VLDL、LDL等のリポ蛋白質についてコレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)又はリン脂質等の量比を分析することで虚血性心疾患、肝疾患、糖尿病等の疾病と脂質代謝異常との関連の解明が進められている。ところが、一度の液体クロマトグラフ操作によりリポ蛋白質を粒径、電荷又は疎水性に基づきCM、VLDL、LDL等に分離することは容易であるが、これら各分離画分中のコレステロール量、トリグリセリド(中性脂肪)量及びリン脂質量を同時に検出・測定しようとする、例えばコレステロールの検出・測定のための反応試薬がトリグリセリド(中性脂肪)やリン脂質の検出・測定に影響を与えてしまうという課題がある。

20

#### 【0005】

このため、液体クロマトグラフで分離される分離画分毎にコレステロール、リン脂質、トリグリセリド(中性脂肪)を測定するためには、同一試料を最低3回液体クロマトグラフに供し、第1回目の操作ではコレステロールを、第2回目の操作ではトリグリセリド(中性脂肪)を、そして第3回目の操作ではリン脂質を測定するための反応試薬を混合、反応させ、検出器で検出・測定してクロマトグラムを得る必要があった。

30

#### 【0006】

この結果、各クロマトグラフ操作に先立って、分離カラムから溶出する成分に混合、反応させる反応試薬を準備、交換等するか、あるいは液体クロマトグラフ装置を複数台(例えば3台)用意し、各装置に異なる反応試薬をセットしておき、順次又は一度に全装置を用いて分析を行う必要があった。

#### 【0007】

上記のようにしてリポ蛋白質の分析を行った場合には、分析準備に時間がかかり又は分析に用いる装置台数が増えるという課題以外に、試料を複数回の液体クロマトグラフ操作に供さなければならないために比較的大量の試料が必要になるという課題もある。また更には、1台の液体クロマトグラフを用いて複数回の操作を行う場合には各操作を均一に行わないと得られたクロマトグラム同士を比較することができなくなる可能性が生じる。複数台の液体クロマトグラフ装置を使用する場合にも、装置間、例えば分離カラムの劣化状態、送液量、検出器の検出感度等を均一に保たないと同様の課題が生じる。

40

#### 【0008】

そこで本発明の目的は、反応試薬の交換を行う必要がなく、1台の液体クロマトグラフ装置を使用した一回の液体クロマトグラフ操作で、試料中に含まれるCM、VLDL、LDL等のリポ蛋白質についてコレステロール、トリグリセリド(中性脂肪)、リン脂質等の量比を分析し得る液体クロマトグラフィー装置を提供することにある。

50

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために成された本発明は、試料中のリポ蛋白質を分析する液体クロマトグラフィー装置であって、単一流路を用いて試料を分離カラムに導入し、分離カラムから溶出した成分を分割してそれぞれが検出器を備える複数の流路に導き、各流路に導かれた成分ごとに前記検出器を用いてリポ蛋白質の検出・測定を行うようにした装置である。以下、本発明の試料中のリポ蛋白質を分析する液体クロマトグラフィー装置（以下単に「本発明の装置」等と記載する）を詳細に説明する。

## 【0010】

本発明の装置には、試料中のリポ蛋白質を粒径、電荷又は疎水性に基づいてCM、VLDL又はLDL等に分離するための分離カラムが装備される。分離カラムは、例えばリポ蛋白質の粒径に基づいてリポ蛋白質を分離しようとする場合にはゲルろ過用カラム、リポ蛋白質の電荷に基づいてリポ蛋白質を分離しようとする場合にはイオン交換カラム、そしてリポ蛋白質の疎水性に基づいてリポ蛋白質を分離しようとする場合には逆相カラムを用いればよい。各種のカラムとしては市販されているもの（例えばゲルろ過用カラムであれば、東ソー（株）製、商品名TSKgel Lipopak XL等）を使用することが例示できる。

10

## 【0011】

本発明の装置では、血清、血漿、細胞培養上清等の試料を単一流路を用いて分離カラムに導入する。ここで試料を液体クロマトグラフ装置に導入するには通常のオートサンプラー等を、試料や溶離液の送液には通常のポンプを、単一流路を形成する管には通常の液体クロマトグラフィーで用いるもののうちリポ蛋白質や後述する反応試薬に対して不活性なものを、それぞれ使用することができる。なお、溶離液は、用いる分離カラムの種類に応じて適宜決定する。例えばゲル濾過用カラムを用いるのであれば、100mM以上の塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の塩成分をイオンの相互作用の低減を目的として加えることが例示できる。

20

## 【0012】

本発明の装置では、分離カラムから溶出した成分を2以上に分割して、それぞれが検出器を備える複数の流路に導き、各流路に導かれた成分ごとにこの検出器を用いてリポ蛋白質の検出・測定を行うようにした点に特徴を有する。ここで本発明の装置における分割とは、試料に含まれるリポ蛋白質を粒径、電荷又は疎水性に基づいて分離した状態で2以上に分けることを意味する。従って、分割された成分は完全に同一の組成であり、かつ、各組成の比率完全に同一である。

30

## 【0013】

分離カラムから溶出した成分を分割してそれぞれが検出器を備える複数の流路に導くために、分離カラムの後ろ（下流）側にはスプリッターが配置される。スプリッターは、分離カラムからの溶出成分を2以上に分割できるものであれば良いが、分割する比率を調整できるスプリッター（例えばUPCHURCH SCIENTIFIC INC.製、商品名マイクロスプリッターP-450）を用いることが好ましい。かかる分割比率を調整できるスプリッターであれば、例えば、比較的高感度で検出・測定ができるものについて検出・測定を行う流路への流量を少なく、逆に比較的低感度の低い検出・測定を行う流路への流量を多くすることが可能となるからである。また本発明において流路を3分割する場合には、3分割用のスプリッターを用いる以外に2分割用のスプリッターを2台接続して使用することもできる。

40

## 【0014】

スプリッターの後ろ（下流）側に接続する流路には、前記同様、通常の液体クロマトグラフィーで使用する管を用いることができる。流路の数は、2本以上であれば良いが、分離カラムでリポ蛋白質の粒径、電荷又は疎水性に基づいて分離したCM、VLDL又はLDL等について、後に何種類の測定を行うかにより適宜決定できる。現在のところ、コレス

50

テロール、トリグリセリド（中性脂肪）及びリン脂質の量比に関する知見が虚血性心疾患、肝疾患、糖尿病等の疾病と脂質代謝異常との関連の解明するうえで重要であるとされていることから、分離カラムから溶出した成分を3分割して3本の流路に導き、各流路に導かれた成分ごとにコレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）又はリン脂質の測定を行い得るように3本の流路をスプリッターに接続することが特に好ましい。むろん、前記以外に、例えばビタミンE等の検出・測定が必要となった場合には、スプリッターに接続する流路の本数を4本以上に増やせば良い。

**【0015】**

各流路に導かれた成分ごとに行うコレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）又はリン脂質の測定は、分割後、各流路に導かれた成分に対し、コレステロール反応試薬、トリグリセリド（中性脂肪）反応試薬又はリン脂質反応試薬等を混合、反応させた後に検出器に導入し、各反応試薬との反応の様子を測定することが例示できる。即ち、例えば分離カラムから溶出した成分を3分割して第1、第2又は第3の流路に導き、第1の流路についてはコレステロール反応試薬を混合、反応させて測定を行い、第2の流路についてはトリグリセリド（中性脂肪）反応試薬を混合、反応させて測定を行い、そして第3の流路についてはリン脂質反応試薬を混合、反応させて測定を行うことが具体的に例示できる。

10

**【0016】**

上記具体例を実施するためには、例えば、各流路の検出器に至る前の部分に反応コイルを配置し、この反応コイルの直前に、各反応試薬を貯蔵する液溜めからの流路を送液ポンプを介して接続する等すれば良い。

20

**【0017】**

上記各反応試薬について一例を記載すれば、コレステロール反応試薬ではコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼを含む試薬液を、トリグリセリド（中性脂肪）反応試薬ではリポプロテインリパーゼ、グリセロールオキシダーゼを含む試薬液を、リン脂質反応試薬ではホスホリパーゼ、コリンオキシダーゼを含む試薬液を例示できる。ここで反応試薬は、リポ蛋白質を分解してコレステロール、トリグリセリド又はリン脂質を対応する反応試薬と反応可能な状態とするための界面活性剤を含むことが好ましい。かかる好ましい各反応試薬として、市販の試薬（コレステロール反応試薬では、協和メディクス（株）製・商品名デタミナーLTC、東洋紡（株）製・商品名コラスカラーリキッド、第一化学薬品（株）製・商品名ピュアオートSCHO-N；トリグリセリド（中性脂肪）反応試薬では、協和メディクス（株）製・商品名デタミナーTG、第一化学薬品（株）製・ピュアオートS TG-N）を用いることもできる。

30

**【0018】**

各流路が装備する検出器は、コレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）、リン脂質等の成分を検出してその量を測定し得るものであれば特に制限はない。例えば前記したようにコレステロール反応試薬、トリグリセリド（中性脂肪）反応試薬又はリン脂質反応試薬等を混合、反応させた後に検出・測定を行うのであれば、同一の吸光度検出器等を2台以上用いることも可能である。

**【0019】**

本発明の装置では、分離カラムからの溶出成分を分割する数（即ちスプリッターに接続する流路の本数）、分割後のコレステロール等の検出・測定方式、そして各流路が備える検出器の検出感度等を考慮したうえで、分析に供する試料の量を決定することが好ましい。例えば前記したような反応試薬を用いる場合であって、流路を2分割するのであれば、少なくとも15 $\mu$ l、好ましくは20 $\mu$ l程度の試料を用いることが好ましい。このように、分離カラムからの溶出成分を均等に分割するのであれば、各流路に10 $\mu$ lの成分が導かれるように、流路の本数 $\times$ 10 $\mu$ lの試料を用いることが一応の目安として例示できる。

40

**【0020】****【発明の実施の形態】**

以下、本発明を図面に記載した実施の形態及び実施例を用いてより詳細に説明するが、本

50

発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】

図1は、本発明装置の概略を説明するための図である。1は溶離液溜め、2は脱気装置（デガッサ）、3は送液ポンプ、4はオートサンプラー、5はフィルター、6は分離カラム（本例では2本のカラムを直列に配置して分離能を向上した）、7はカラムオープン、8は流路2分割用のスプリッター、9は抵抗管、10及び11は反応コイル、13及び14は検出器、15は反応試薬用送液ポンプ、16はエアートラップ、17はコレステロール反応試薬溜め、18はトリグリセリド反応試薬溜めをそれぞれ示す。

【0022】

オートサンプラーによって分離カラムに至るまでの単一流路に導入された試料は、分離カラムでリポ蛋白質の粒径、電荷又は疎水性に基づき分離され、溶出する。溶出した成分はスプリッターにて2分割され、それぞれ異なる流路に導入される。一方の流路では、分割された成分に対してコレステロール反応試薬が混合され、反応コイルで反応された後、検出器に導かれてコレステロールの検出・測定が行われる。他方の流路では分割された成分に対してトリグリセリド反応試薬が混合され、反応コイルで反応された後、検出器に導かれてトリグリセリドの検出・測定が行われる。

【0023】

実施例1

図1に示した装置を用いて、ヒト血清中のリポ蛋白質分析を行った。なお、図1における送液ポンプ3としては市販の製品（東ソー（株）製、商品名CCPS）、反応試薬用送液ポンプ15としては市販の製品（東ソー（株）製、商品名CCPM-2）、オートサンプラー4としては市販の製品（東ソー（株）製、商品名AS-8020）、フィルター5としては市販の製品（東ソー（株）製、フィルターK）、カラム6としては市販の製品（東ソー（株）製、TSK gel Lipopropak XL、カラムサイズ；7.8 mm I.D. x 30 cm）を用いた。

【0024】

抵抗管9としては0.2 mm I.D. x 2 mサイズのステンレス製管を、反応コイル10、11としてはそれぞれ0.4 mm I.D. x 7.5 m、0.4 mm I.D. x 40 mのサイズのテフロン製管を用いた。

【0025】

カラムオープン7とリアクター12としては共に市販の製品（東ソー（株）製、商品名CO-8020）を用い、それぞれの設定温度を25、37とした。検出器13、14としてはそれぞれ市販の製品（東ソー（株）製、商品名UV-8020、UV-8000）を用い、それぞれの検出波長を共に550 nmとした。

【0026】

エアートラップ16としては市販の製品（東ソー（株）製、商品名エアートラップG）、デガッサ2としては市販の製品（東ソー（株）製、商品名SD-8022）を用いた。

【0027】

溶離液1としては50 mM トリス及び300 mM 酢酸ナトリウムを含むpH 8.0の溶液を用い、流速は0.60 ml / 分とした。スプリッター8としては市販の製品（UPC HURCH SCIENTIFIC INC. 製、商品名マイクロスプリッターP-450）を用い、カラム分離後の溶出液を等量に分割するように調整した。

【0028】

コレステロール反応試薬17については、市販の試薬（第一化学薬品（株）製、商品名ピュアオートS CHO-Nの試薬1と2をあらかじめ2対1の割合で混合した反応試薬）を用い、その流速は0.15 ml / 分とした。トリグリセリド（中性脂肪）反応試薬18については、（第一化学薬品（株）製、商品名ピュアオートS TG-Nの試薬1と2をあらかじめ2対1の割合で混合した反応試薬）用い、その流速は0.30 ml / 分とした。

【0029】

正常人血清をオートサンプラー 4 にて 15  $\mu$ l 装置に供してカラム 6 で分離し、スプリッター 8 で等量に分割した。うち一方をコレステロール反応試薬と混合し反応コイル 10 にて反応させ、検出器 13 により 550 nm の波長で検出・測定した。分割した他方をトリグリセリド（中性脂肪）反応試薬と混合し反応コイル 11 にて反応させ、検出器 14 により 550 nm の波長で検出・測定した。結果を図 2 及び図 3 に示す。

#### 【0030】

図 2 はコレステロールに関する検出・測定結果（クロマトグラム）を示すものである。LDL と HDL のピークは良好に確認でき、分析に供した試料が 15  $\mu$ l と微量であったにもかかわらず、VLDL についても LDL のピーク前部分に分離が不完全ではあるが、ピークが確認できた。

10

#### 【0031】

図 3 はトリグリセリド（中性脂肪）の検出・測定結果（クロマトグラム）を示すものである。CM、LDL、HDL、FG（遊離グリセロール）のピークは良好に確認でき、分析に供した試料が 15  $\mu$ l と微量であったにもかかわらず、VLDL についても LDL のピーク前部分に分離が不完全ではあるが、ピークが確認できた。

#### 【0032】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、反応試薬の交換を行う必要がなく、1 台の液体クロマトグラフ装置を使用した一回の液体クロマトグラフ操作で試料中に含まれる CM、VLDL、LDL 等リポ蛋白質について、コレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）又はリン脂質の量を検出・測定し、分析し得る液体クロマトグラフィ装置が提供される。

20

#### 【0033】

この結果、リポ蛋白質を分離カラムにて分離した後、溶出した成分を複数の流路に導き、各流路ごとに装備された検出器を用いて検出・測定を行う本発明の分析装置によれば、1 台の装置のみを用いた場合であっても、反応試薬の交換を行うことなく、一回の操作で試料中に含まれるリポ蛋白質についてコレステロール量、リン脂質量、トリグリセリド（中性脂肪）量を検出・測定し、最終的には試料中に CM、VLDL 又は LDL といったリポ蛋白質毎にコレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）又はリン脂質がいかなる量比で存在しているのかという分析を可能にすることができる。

#### 【0034】

従って本発明の装置によれば、同様の分析結果を得るために複数回のクロマトグラフィ操作を行ったり複数台の液体クロマトグラフ装置を用いなければならない従来の方法と比較して、より短時間に、より少ない試料を用いるのみで分析結果を得ることが可能となる。

30

##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明の装置の概略を説明するための図である。

【図 2】図 2 は、実施例 1 におけるコレステロール検出・測定の結果（クロマトグラム）であり、横軸は試料を装置に供してからの時間（分）を示す。図中の VLDL、LDL、HDL は、それぞれ超低比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、高比重リポ蛋白質を示す。

【図 3】図 3 は、実施例 1 におけるトリグリセリド（中性脂肪）検出・測定の結果（クロマトグラム）であり、横軸は試料を装置に供してからの時間（分）を示す。図中の CM、VLDL、LDL、HDL、FG は、それぞれカイロミクロン、超低比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、高比重リポ蛋白質、遊離グリセロールを示す。

40

##### 【符号の説明】

1 溶離液、2 デガッサー、3 送液ポンプ、4 オートサンプラー、5 フィルター、6 分離カラム、7 カラムオープン（恒温器）、8 スプリッター、9 抵抗管、10・11 反応コイル、12 リアクター（恒温器）、13・14 検出器、15 反応試薬用送液ポンプ、16 エアータップ、17 コレステロール反応試薬、18 トリグリセリド反応試薬



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 3 5 2 1 1 9 ( J P , A )  
特開平 0 9 - 0 1 5 2 2 5 ( J P , A )  
特開平 0 8 - 1 0 5 8 7 6 ( J P , A )  
特開平 0 9 - 0 1 2 6 2 9 ( J P , A )  
特開平 0 8 - 3 2 0 3 1 3 ( J P , A )  
特開平 0 7 - 0 3 5 7 4 7 ( J P , A )  
特開昭 6 2 - 2 0 9 3 5 8 ( J P , A )  
実開昭 6 1 - 0 6 5 3 5 1 ( J P , U )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 30/78  
G01N 30/84  
G01N 30/88  
JST7580(JDream2)  
JSTPlus(JDream2)