

LDL-C 試薬・KL「コクサイ」の性能評価

宮本 郁弓, 角田 浩一, 門田 雅子, 新井 信夫,
萩野 浩史, 船越 國宏, 藤本 敬二

シスメックス株式会社 学術本部：神戸市西区室谷1-3-2 (〒651-2241)

SUMMARY

シスメックスでは2002年よりLDLコレステロール(LDL-C)直接法測定試薬として、LDL-C試薬・KL「コクサイ」を販売している。今回、安定性の向上を図るため、本試薬の組成を見直したので、改良試薬の基礎的な性能検証を実施した。

濃度の異なる3種のコントロール血清を用いた同時再現性試験(n=20)では、変動係数は0.63%~1.42%であった。LDL画分を調整した高濃度LDL-C検体を段階希釈したものを試料として直線性を検討したところ、400mg/dLまで直線性が認められた。また、試料中に共存するヘモグロビンは500mg/dL、ビリルビンは30mg/dL、アスコルビン酸は100mg/dLまで測定に影響を及ぼさなかった。患者血清53検体を用いた現行試薬と改良試薬との相関は、相関係数： $r = 0.998$ 、回帰式： $y = 0.997x + 1.33$ (mg/dL) と良好であった。また、米国Centers for Disease Control and Prevention (CDC) リファレンス法である β -quantification 法(BQ法)との相関も、相関係数： $r = 0.988$ 、回帰式： $y = 1.005x + 1.70$ (mg/dL) と良好な結果であった。管理用試料を用いて試薬安定性を確認した結果、今回の改良により製造後安定性が8ヶ月から12ヶ月に延長されたことも確認された。

Key Words LDLコレステロール, BQ法

はじめに

血清中のLDLコレステロール(LDL-C)測定は、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪濃度からFriedewald推定式¹⁾で間接的に求める方法、または超遠心法²⁾が今までは一般的に用いられていた。しかしながら、Friedewald式を用いた推測値では、計算式の中に中性脂肪値が含まれているため、食事による影響を受けやすいことや、高中性脂肪検体では、偽低値を示し正確性に欠けるなどの問題が知られている³⁻⁵⁾。また、超遠心法は、操作が煩雑で、多検

体処理に難があるなどの問題点を抱えている。最近、遠心分離作業を必要としない直接法(ホモジニアス法)が開発され、汎用自動分析装置にて容易に測定することが可能となったことから、LDL-C測定は広く普及している。当社でも、2002年よりLDL-C直接法測定試薬としてLDL-C試薬・KL「コクサイ」を発売している。今回、本試薬の安定性を向上させ、使用期限の延長を行ったので、その基礎性能について報告する。

測定原理⁶⁾

第一反応において、LDLと硫酸カリクス[8]アレンは可溶性複合体を形成し、LDLを安定化する。他のリポ蛋白は、コレステロールエステラーゼ活性を有するリポ蛋白リパーゼLPL (CE) でエステル型および遊離型コレステロールに分解され、さらに、エステル型コレステロールは、LPL (CE) の作用で遊離型コレステロールになる。遊離型コレステロールは、コレステロールオキシダーゼ (CO) とヒドラジンの作用によって、コレステロール脱水素酵素 (CDH) に触媒されないようコレステノンヒドラゾンになる (図1)。

第二反応で、可溶性複合体を形成しているLDLをコール酸の存在下、LPL (CE) を用いて分解する。遊離したエステル型コレステロールをLPL (CE) を用い

て遊離型コレステロールに、遊離型コレステロールをCDHが β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (β -NAD⁺) の存在下でコレスト-4-エン-3-オンに酸化する。このとき生じる β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (β -NADH) の生成量を波長330~350nmにおける吸光度変化より求め、LDL-C濃度を測定する。ヒドラジンはコレスト-4-エン-3-オンを捕捉することで β -NADH を安定化する (図1)。

材料および方法

1. 試薬および標準液

- 1) LDL-C試薬・KL「コクサイ」現行試薬および改良試薬
- 2) 脂質キャリブレーター (KL)

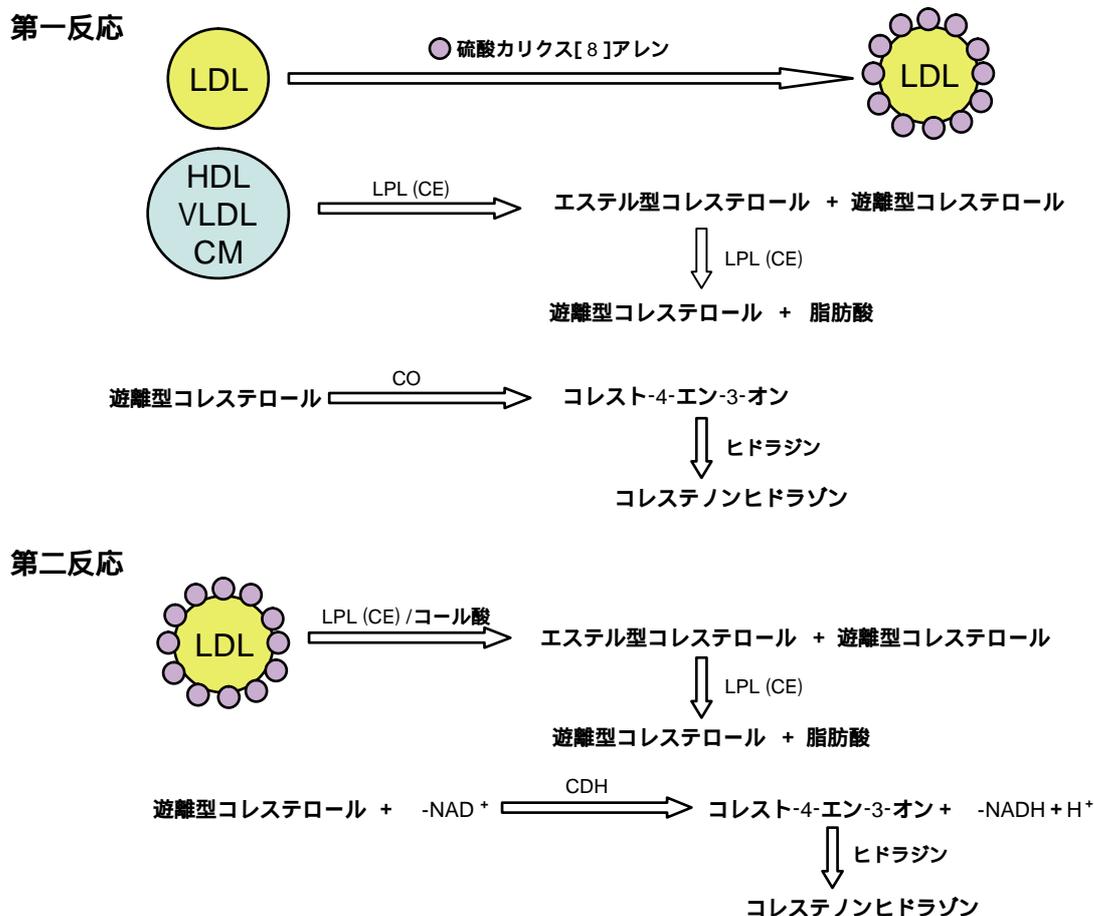


図1 . LDL-C 試薬・KL「コクサイ」反応原理

2. 使用機器

日立7170 S型自動分析装置および日立7180型自動分析装置(日立ハイテクノロジーズ社)

3. 検討項目, 測定方法, 試料

検討項目, 測定方法, 試料については結果の項に記載する。

4. 分析条件

測定は, 表1に示した条件で実施した。現行試薬では, 副波長が660nmであるが, 改良試薬では溶血の影響を軽減するため570nmに変更している。なお, 米国Centers for Disease Control and Prevention (CDC) リファレンス法である¹⁾quantification法(以下BQ法²⁾の測定は, CRMLN (US Cholesterol Reference Method Laboratory Network) のメンバーである大阪府立健康科学センターに協力いただいた。CRMLNは米国から3施設と米国外から7施設の計10施設の脂質基準分析室で構成される国際標準化のネットワークであり, 大阪府立健康科学センターはCRMLNのメンバーとして正式登録されており, LDL-Cをはじめ脂質項目について認証資格を保有している。

結果

1. 同時再現性

濃度の異なる3種のコントロール血清(HDLコントロール・L, M, H)を用いて, 20回連続測定を行い同時再現性を確認した。現行試薬の変動係数(CV%)は, それぞれ0.53%, 0.61%, 2.73%であったのに対し, 改良試薬は, それぞれ0.63%, 0.74%, 1.42%と現行試薬と同等の結果が得られた(表2)。

2. 直線性

HDLコントロール・LおよびLDL画分を調整して作成した高濃度LDL-C検体を生理食塩水にて段階希釈したものを直線性検討用の試料とした。高濃度域においては, 400mg/dLまで, 低濃度域においては, 原点から40mg/dLまでの直線性が得られた(図2)。

3. 干渉物質の影響

HDLコントロール・Mに干渉チェック・Aプラス(遊離型ビリルビン, 抱合型ビリルビン, ヘモグロビン, 乳び)およびアスコルビン酸を添加し, 各種濃度の試料を調整して, 干渉物質の影響を検討した。遊離型ビリルビン, 抱合型ビリルビンは30mg/dLまで, ヘモグロビンは500mg/dLまで, 乳びは2000ホルマジン濁度まで, アスコルビン酸は100mg/dLまで, 測定値に影響は認めなかった(図3)。

表1. 分析条件

	改良	現行
分析方法	2ポイントエンド	2ポイントエンド
主波長 / 副波長 (nm)	340 / 570	340 / 660
検体量 (μL)	4	4
第1試薬 (μL)	180	180
第2試薬 (μL)	60	60

表2. 同時再現性

	HDLコントロール・L		HDLコントロール・M		HDLコントロール・H	
	改良	現行	改良	現行	改良	現行
MEAN (mg/dL)	152.4	157.7	120.8	125.3	39.4	36.6
SD	0.95	0.84	0.89	0.76	0.56	1.00
C.V. (%)	0.63	0.53	0.74	0.61	1.42	2.73
Range	4.2	3.1	3.6	3.0	1.9	3.5

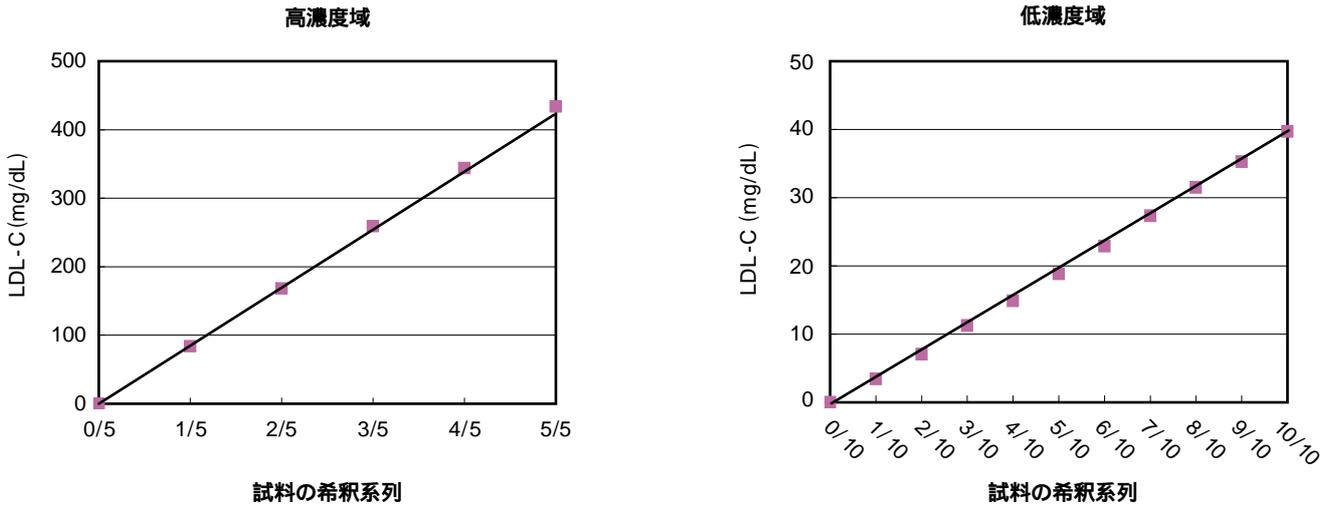


図2 . LDL-C直線性

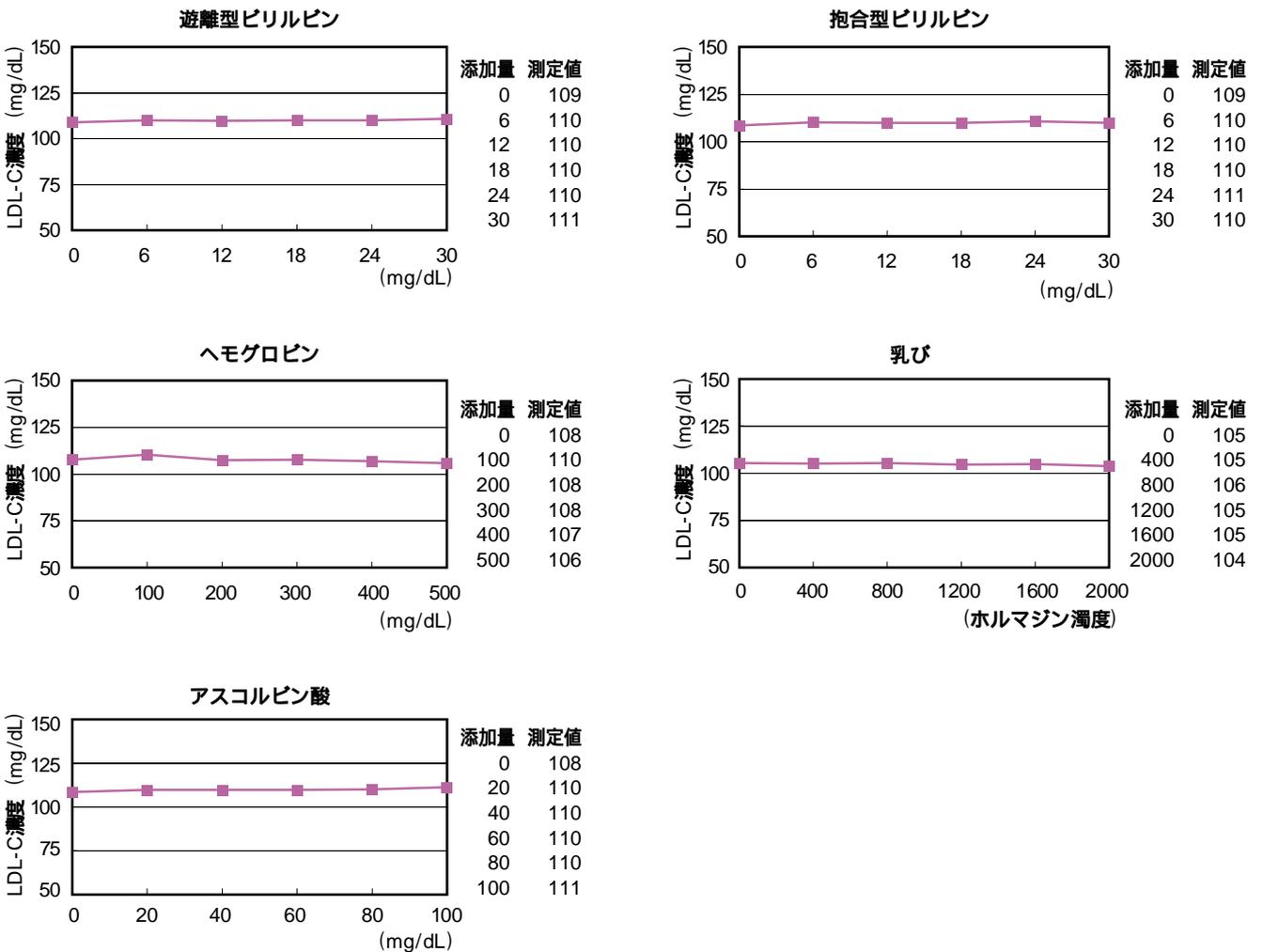


図3 . 干渉物質の影響

4 . 相関性

患者血清53検体を用いて改良試薬と現行試薬およびBQ法との相関性を検討した。現行試薬との相関は、 $r = 0.998$ 、 $y = 0.997x + 1.33$ 、BQ法との相関は、 $r = 0.988$ 、 $y = 1.005x + 1.70$ と、どちらにおいても良好な結果が得られた(図4)。

5 . 試薬安定性

現行のLDL-C試薬・KL「コクサイ」は、使用期限を製造後8ヶ月としていたが、改良試薬では、12ヶ月に延長した。管理用試料2濃度を使用した安定性評価では、冷蔵保存下製造後12ヶ月間まで安定した測定結果を得ることができた(図5)。

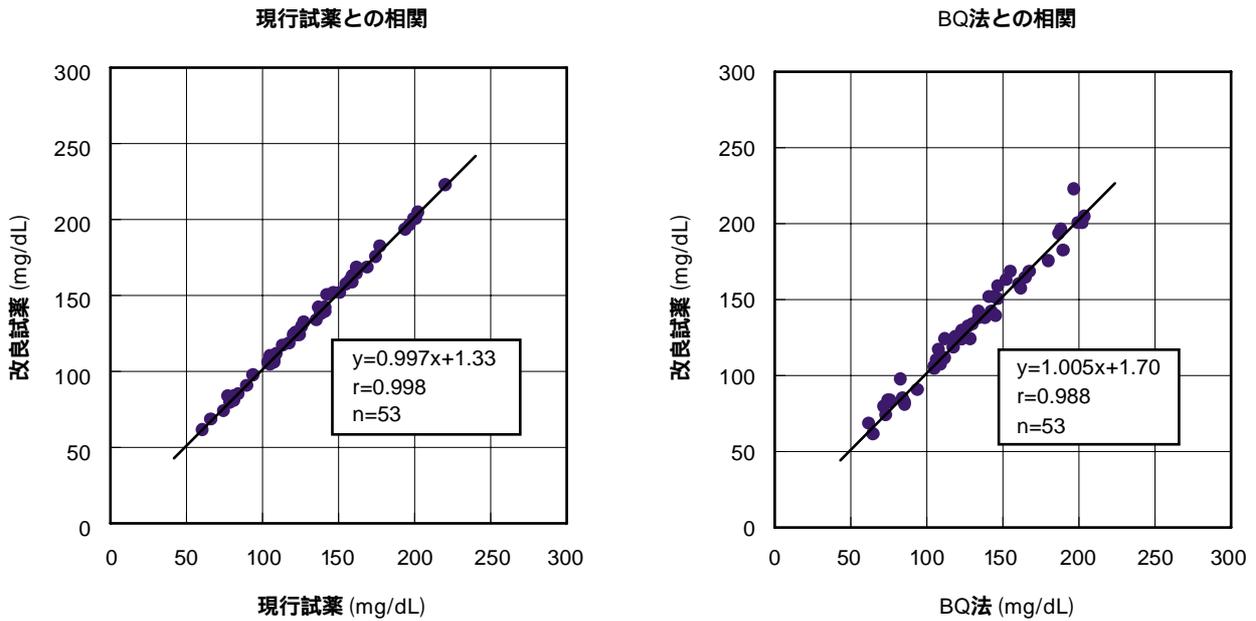


図4 . 相関図

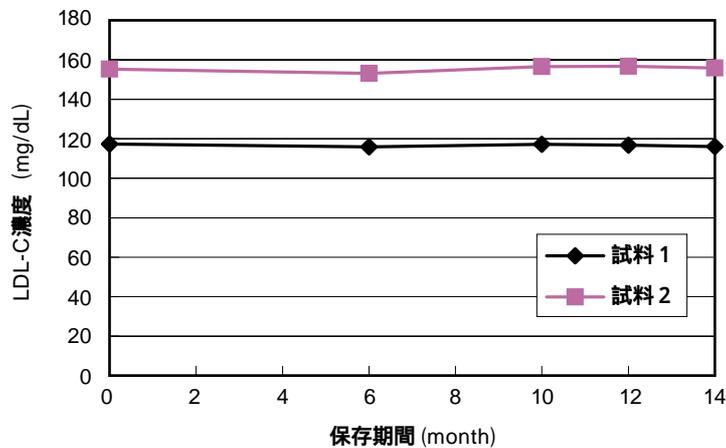


図5 . 試薬安定性

まとめ

LDL-Cは動脈硬化の危険因子の一つとして広く知られ、日本動脈硬化学会の「動脈硬化性疾患診療ガイドライン2002年版」にも、高脂血症として、高LDLコレステロール血症が示されている(基準値上限は140mg/dL)⁸⁾。さらに、昨今の健康志向ブームにおいて、一般の人々にも、LDL-Cが広く認知されるようになってきている。また、平成20年度より開始されるメタボリックシンドローム検診の10項目の中にLDL-Cが含まれている⁹⁾ことから、本検査が今後重要な血液検査項目になるものと思われる。

LDL-C試薬・KL「コクサイ」改良試薬の基本性能を検証したところ、同時再現性は、CV 0.63～1.42%と良好であり、干渉物質の影響も認められなかった。本試薬と現行試薬および米国CDCリファレンス法のBQ法との相関は、どちらも良好な相関結果が得られた。

また、試薬の保存安定性も1年間有効であるという性能が確認できた。

参考文献

- 1) Freidwald WT, Levy RI, Fredrickson DS : Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clin Chem, 18 : 499 ~ 502, 1979.
- 2) Havel RJ, Eder HA, Brangdon JH : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest, 34 : 1345 ~ 1353, 1955.
- 3) Demacker PN, et al.: Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared. Clin Chem, 30 : 1797 ~ 1800, 1984.
- 4) McNamara JR, et al.: Calculated values for low-density lipoprotein cholesterol in the Assessment of lipid abnormalities and coronary disease risk. Clin Chem, 36 : 36 ~ 42, 1990.
- 5) Warnick GR, et al.: Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedwald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. Clin Chem, 36 : 15 ~ 19, 1990.
- 6) 岸浩司, 他 : LDL-C試薬・KL「コクサイ」の基礎的検討. Sysmex J, 25 : 14 ~ 21, 2003.
- 7) Becher JD, et al.: Measurement of Low-density lipoprotein cholesterol Concentration, In : Rifai N and Warnick GR, ed. Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Washington, DC : American Association of Clinical Chemistry, 107 ~ 123, 1994.
- 8) 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患診療ガイドライン2002年版.
- 9) 厚生労働省 : 標準的な検診・保健指導プログラム(暫定版)

Basic Evaluation of LDL-C Reagent • KL

Ikumi MIYAMOTO, Hirokazu KAKUDA, Masako KADOTA, Nobuo ARAI,
Hirofumi HAGINO, Kunihiro FUNAKOSHI and Keiji FUJIMOTO

Scientific Affairs, Sysmex Corporation,
1-3-2, Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241

SUMMARY

Sysmex Corporation developed LDL-C Reagent•KL which was a direct method assay kit for LDL cholesterol measurement in 2002. This time, we evaluated the new kit of which shelf life had improved.

In the evaluation of within-run reproducibility, we used the control sera of 3 concentration. CV_s were shown in 0.63~1.42%. The linearity was observed up to 400mg/dL. Hemoglobin (500mg/dL), bilirubin (30mg/dL) and ascorbic acid (100mg/dL) did not interfere in the assay. The correlation coefficient using fresh sera (n=53) between the present kit and the improved kit was 0.998 and the regression formula was $y=0.997x+1.33$. On the other hand, the correlation coefficient between the improved kit and -quantification method (BQ method) was 0.988 and the regression formula was $y=1.005x+1.07$. It was confirmed that the shelf life of kit was extended to 12 months from 8 months.

Key Words LDL cholesterol, BQ method
