

体外診断用医薬品

\* 2016年3月改訂(第2版)

2010年7月作成(第1版)

リポ蛋白分画キット

®

# リポフォーAS

## 〔全般的な注意〕

ア. 本製品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないで下さい。

イ. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

ウ. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。

エ. 添付文書以外の使用方法については保証を致しません。

## 〔形状・構造等(キットの構成)〕

①ゲル管 100本

アクリルアミド

N,N'-メチレンビスアクリルアミド

②ローディングゲル 1本 24mL

アクリルアミド

N,N'-メチレンビスアクリルアミド

ズダンブラックB

③バッファ 11g

## 〔使用目的〕

ヒトの血清中のリポ蛋白質の分画による検出

## 〔測定原理〕

ポリアクリルアミドゲルディスク(PAG Disc)電気泳動法に基づいてヒトの血清中のリポ蛋白質を分析する方法で、脂質に特異的に結合する色素であるズダンブラックB<sup>1,2)</sup>を含むローディングゲル溶液と検体をゲル管上層部に層積してサンプルゲルを作製します。検体中の脂質は各リポ蛋白質濃度の割合に応じて競合的に色素と結合します。ゲル管中のポリアクリルアミドゲルは最終的にサンプルゲル、濃縮ゲル及び分離ゲルの3層になります。通電を開始するとサンプルゲル中のリポ蛋白質が濃縮ゲル中に移動し、そこで濃縮され、非常に薄い円盤状のゾーンを形成します。その後、リポ蛋白質は、分離ゲル中に移動し、ゲルの分子ふるい効果によって分子サイズの順に分離されます<sup>3)</sup>。電気泳動終了後、泳動像から、濃度図を作成し分画比(%)を作成します。

## 〔操作上の注意〕

(1) 検体採取のため少なくとも1週間程度、普通の食事制限を行い、検体採取前12~16時間は絶食させてください。

(2) 抗凝固剤としてヘパリンは使用できません。脂質改善剤であるヘパリンは、リポ蛋白質に影響を及ぼす可能性があります。

(3) できるだけ新鮮な検体を使用してください。

特にIDL(ミッドバンド)は不安定なため<sup>4)</sup>、血清中の酵素等の影響を受けることがあります。

保存する場合は凍結せず2~8°Cで保存してください。凍結によりリポ蛋白質が壊れることがあります<sup>4)</sup>。

(4) 検体を入れず、ローディングゲルのみで泳動を行わないでください。リポ蛋白質に結合していない荷電を帯びたズダンブラックBの一部がゲル中に移動し、アーチファクトとなることがあります。

(5) 総コレステロール値が80mg/dL以下の血清や血漿を検体とする場合、残余の色素が泳動されることがあります。

(6) ローディングゲルは使用前必ず室温に戻してください。冷たいまま使用するとゲルが固まらないことがあります。また、使用後は2~8°Cで保存してください。

(7) ゲル管を0°C以下に保存すると室温に戻したとき気泡が出たり、泳動中にゲルが飛び出すことがあります。

## 〔用法・用量(操作方法)〕

(1) 検体の採取

検体は血清を用います。

(2) 検体の分注

① ゲル管の上に残っている保存バッファを、静かに振って取り除きます。

② ゲル管をゲル管立てに立て、ゲル管上部に検体を25  $\mu$ L分注します。

③ その上にローディングゲルを200  $\mu$ L加え、サンプルゲルを作ります。

④ ゲル管の上にパラフィルム等をのせ、3~4回転倒混和します。

(3) 光重合

① 30~45分間、昼光色の光重合器の下で光重合させます。ゲル管はできるだけ蛍光ランプに近づけてください。光が弱かったり昼光色以外のランプを使用するとゲルが固まり難かったり、VLDLの分画値が異常に高くなることがあります。

・光重合時間が30分以内の場合や、45分以上光重合を行った場合、再現性が悪くなる場合があります。

・光重合後のローディングゲルは大変柔らかいので振ったりすると壊れることがあります。

#### (4) バッファの準備

①光重合している間にバッファを用意します。

- ・バッファ1本を1200mLの精製水で溶解して使用します。
- 小分けして使用する場合は500mLの精製水に溶解し、ストックバッファとします。使用時に、ストックバッファと精製水を2:3の割合で混合して使用します。(例:ストックバッファ100mLに対し、精製水を150mL混合する。)

#### (5) 泳動槽へのセッティング

①光重合後のゲル管を丸型ディスク電気泳動槽の上部にセットします。

②ゲル管の上下が充分浸るように、用意しておいたバッファを上下の泳動槽に適量注入します。

- ・ゲルに触ったり圧力を加えたりしないでください。
- ・検体数が少ない場合は使用しない部分に使用済みのゲル管またはマイクロピペット用チップを差し込んで、上槽のバッファが流れ落ちないようにします。
- ・ゲル管とバッファの間に空気が残らないようにしてください。空気があると電気が流れず、その部分は泳動されません。気泡を作らないため、バッファを入れる前に予めバッファをゲル管とゴムリングの間にスポイト等で分注しておくといでしょう。下部の気泡は、泳動槽を静かに揺り動かして取り除きます。

#### (6) 電気泳動

①通電は上槽を陰極(－)、下槽を陽極(＋)にし、150Vの定電圧で、泳動します。

②HDL分画がゲル管の底より4～5mm位になったら泳動を終えます。

- ・定電流で泳動を行うと、VLDLバンドが弓状になることがあります。
- ・ゲル管1本当たり約3～4mAの電流が流れます。これが狂っている場合は泳動槽の白金線の汚れや泳動バッファの調製ミスによると思われます。結果的に正しい泳動像が得られないことがあります。
- ・泳動中の室温により泳動時間が変わることがありますのでできるだけ一定の室温下で泳動されることをお勧めします。

#### (7) デンシトメトリー

・電気泳動後、2時間以内に濃度計で、ゲル管のまま測定してください。VLDL、(IDL)、LDL、(small LDL)、HDLの各分画値の合計を100%として分画%を算出します。干渉フィルターを使う場合の測定波長は600～625nmを使用します。

- ・泳動後のゲルに気泡が生じ、測定の妨害になる場合は針付注射器等で取り除いてください。
- ・カイロマイクロンの部分すなわちサンプルゲルは、測定しないでください。この部分には、残余の被染色物があるため測定の妨害となります。
- ・測定する前に約30分間放置しておく、HDLの直前に泳動されたアルブミンのシャープな屈折線を消すことができます。
- ・泳動後のゲル管の保存はできません。大切な検体は、写真を撮っておいてください。

#### 〔測定結果の判定法〕

濃度計でデンシトメトリーを行い、VLDL、(IDL)、LDL、(small LDL)、HDLの各分画のパーセントを求める。また、IDLやsmall LDLの有無を確認する。

本法は、WHOの型判定などの要求に対するいくつかの分析方法の1つであり、これだけでWHOの型判定を行うことはできません。患者の臨床症状、家族歴、その他の検査結果(コレステロール、トリグリセライド、冷却後の血清の外観、アポリポ蛋白定量等)などを考慮して判断してください<sup>6,7)</sup>。なおLDLの相対移動度(RM)を用いてIDL(ミッドバンド)や小粒子(small) LDLを算出する例もあります<sup>8)</sup>。

健常値は使用している濃度計や年齢、性別、地域差などを考慮して各施設で設定されることをお勧めします。

#### 〔性能〕

##### 1. 感度

精製水を試料として操作した場合、LDL分画部分とHDL分画部分に青いバンドが出現しないこと。管理血清を3倍希釈したものを試料として操作するとき、VLDL、LDL、HDLの各分画が明瞭に分離し、識別できること。

##### 2. 特異性

精製水を試料として操作した場合、LDL分画部分とHDL分画部分に青いバンドが出現しないこと。管理血清を試料として操作するとき、VLDL、LDL、HDLの各分画が明瞭に分離し、識別できること。

##### 3. 再現性

健常人血清を試料として3回同時に測定するとき、VLDL、LDL、HDLの各分画%の最大値と最小値の差は5%以内である。

##### 4. 相関性 (y: 本製品 x: 他製品①)

$$\begin{aligned} \text{VLDL} \quad n=55 \\ y=1.0526x-2.9746 \\ r=0.954 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LDL} \quad n=55 \\ y=0.9066x+10.929 \\ r=0.959 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{HDL} \quad n=55 \\ y=0.9726x-2.3857 \\ r=0.984 \end{aligned}$$

##### (y: 本製品 x: 他製品②)

$$\begin{aligned} \text{VLDL} \quad n=55 \\ y=1.0156x-0.0843 \\ r=0.997 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LDL} \quad n=55 \\ y=0.959x+3.061 \\ r=0.991 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{HDL} \quad n=55 \\ y=0.9703x+0.2337 \\ r=0.994 \end{aligned}$$

その他の性能は主要文献 9)を参考にしてください。

## 〔使用上又は取扱い上の注意〕

(1) ローディングゲルに含まれているアクリルアミド(モノマー)やN, N'-メチレンビスアクリルアミドは催涙性・皮膚刺激性を有する神経性の劇物です。口腔からはもちろん、正常な皮膚からでも体内に吸収されることがありますので、取り扱いには充分注意してください。

光重合以前のローディングゲルを使用して身体に異常を生じた場合は、直ちに医師の診察を受けてください。ただし、ゲル化したものに毒性はありません。

(2) 本キットは2~8℃で保存してください。凍結防止のため2℃以下にはしないでください。

一度凍結させたゲルは、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。

(3) 電気泳動槽の洗浄時、洗剤が残っていると泳動パターンが乱れることがあります。洗剤を使用して洗浄する場合は、大量の水で洗剤を洗い流してください。

(4) 本キットの有効期間は6ヶ月です。使用期限後の製品は、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。

(5) 本製品を使用済み後、廃棄する場合は廃棄物の処理及び清掃に関する法律等の規定に従って処理してください。

## 〔貯蔵方法・有効期間〕

### 1. 貯蔵方法

2~8℃保存(凍結厳禁)

### 2. 有効期間

製造後6ヶ月(使用期限は外箱に記載)

## 〔包装単位〕

100回用

## 〔主要文献〕

1) 菅原和行他: Polyacrylamide gel disc電気泳動による血清リポ蛋白分析法の基礎的検討,衛生検査, vol.27, No.5, 624-627, 1978

2) Mcdona HJ, Ribeiro LP: Ethylene and Propylene Glycol in the Pre-staining of Lipoprotein for Electrophoresis, Clin Chem Acta, vol.4, 458-459, 1959

3) Mniz, N: Measurement of Plasma Lipoprotein by Electrophoresis on Polyacrylamide Gel, Clin. Chem., Vol.23, No.10, 1826-1833, 1977

4) 宮鍋寛他: Midband検出についての基礎的研究と臨床的意義, 第26回関東甲信地区臨床衛生検査学会講演集, 114-116, 1989

5) Classification of Hyperlipidaemias and Hyperlipoproteinaemias, Bull, WHO, vol.43, 891-915, 1970

6) 井上郁夫: リポフォー, キーワードでわかるメタボリックシンドローム, 中外医学社, 161-163, 2008

7) 白井厚治, 齊藤康: 高脂血症 - 診断の手順とデータの読み方, Medicina, vol.26, No.3, 410-414, 1989

8) 三島康男他: 簡便なPAG電気泳動キット(LipoPhor system)を用いたLDL粒子サイズの推定: LipoPrint LDL systemとの比較, 動脈硬化, 25: 67-70, 1997

9) 金澤敏行他: ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法による血清リポ蛋白質の分析および評価, 医療と検査機器・試薬 33: 399-402, 2010

## \*〔問い合わせ先〕

株式会社 明日香特殊検査研究所  
神奈川県川崎市高津区久地1-3-1-405  
電話 044-850-0121(代) FAX 044-850-0040

## \*〔製造販売元〕

株式会社 明日香特殊検査研究所  
神奈川県川崎市高津区久地1-3-1-405  
電話 044-850-0121(代)