

体外診断用医薬品

リポ蛋白分画キット

※平成 22 年 2 月改訂(第 3 版)
※平成 21 年 7 月改訂(第 2 版)
平成 18 年 4 月作成(第 1 版)

製造販売承認番号
16300AMY00122000

リポフォー

〔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. 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。
- ウ. 添付文書以外で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
- | | |
|--------------------------|--------|
| トリス・ド・トリメチルアミン | 1.186g |
| N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン | 7.45mL |
| アクリルアミド | 0.907g |
| N,N'-メチレンビスアクリルアミド | 0.047g |
- ②ローディングゲル
- | | |
|--------------------|----------|
| アクリルアミド | 3.0 g/dL |
| N,N'-メチレンビスアクリルアミド | 0.6 g/dL |
| ズダンブラック B | 4.5mg/dL |
- ③バッファ
- | | |
|----------------|-------|
| トリス・ド・トリメチルアミン | 2.97g |
| ホウ酸 | 8.03g |

〔使用目的〕

ヒトの血漿及び血清中のリポ蛋白の分画による検出

〔測定原理〕

脂質に特異的に結合する色素であるズダンブラック B^{1,2)}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。

電気泳動終了後、泳動パターン、そのデンストグラム、他の検査結果および臨床症状等とを関連づけて、その性質を解釈します。

〔操作上の注意〕

1. (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 時間は絶食してください。
- (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。
特にミッドバンドは不安定なため³⁾、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℃で保存してください。凍結によりリポ蛋白が壊れることがあります。
- (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) 試薬は使用前に室温に戻してください。

〔用法・用量（操作方法）〕

- (1) 検体の採取
検体は血清又は血漿を用います。血漿の場合は抗凝固剤として EDTA(1mg/dL)を使用します⁴⁾。
EDTA は防腐剤としても作用しますので、EDTA 使用検体は数週間保存できます⁵⁾。
- (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 μL 分注します。
 - ③ その上にローディングゲルを 200 μL 加えます。
- ※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、蛍光ランプ（または弊社指定の光重合器（別売））の下で光重合します。ゲル管はできるだけ蛍光ランプに近づけてください。また蛍光ランプは昼光色を使用してください。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らなかったり、VLDL の分画値が異常に高くなる場合があります。
 - ・ 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、再現性が悪くなることがあります。
 - ・ 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 の蒸留水またはイオン交換水で溶解します。
1 回に泳動する検体数が少ない場合、1 本のバッファを 500mL の蒸留水に溶解し、ストックバッファとします。使用時には、ストックバッファと蒸留水を 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、蒸留水を 150mL 混合する。)

- ・ ストックバッファは 2~8℃保存で約 1 ヶ月、保存できます。

(5) 泳動槽へのセッティング

- ① 光重合後のゲル管を泳動槽(または弊社指定の丸型ディスク電気泳動槽(別売))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ぎ入れます。
- ・ 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ういでしょう。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。
 - ・ (株) 常光の「丸型ディスク電気泳動槽」を使用される場合、上槽に約 100mL、下槽には約 150mL 注ぎ入れます。

(6) 電気泳動

- ① 通電は上槽を陰極(−)、下槽を陽極(+)にし、ゲル管 1 本あたりを 5mA に設定し、そのときの電圧で定電圧にし、泳動します。
 - ② HDL 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。(約 20~30 分間)
- ・ 定電流で泳動を行うと、VLDL バンドが弓状になることがあるので、必ず定電圧で行ってください。
 - ・ 泳動槽の白金線の汚れや泳動バッファの調製ミスにより結果が正常に得られないことがあります。この時、電圧は 200V を超えることが多く、泳動槽の掃除やバッファの再調製により電圧は下がり、正しい泳動像が得られるようになります。

(7) デンシトメトリー

- ① 電気泳動後、2 時間以内にゲル管のままデンシトメトリーしてください。
- 濃度計のフィルターは波長:600~625nm を用い、スリット幅:0.3~0.5mm、スリット長:2~3mm
- ゼロベースは VLDL の前あたりの透明な部分を選び、VLDL から HDL までをスキャンニングしてください。
- ・ ゲルの脱水や色抜けを防ぐため泳動像のゲルには強い光を当てないでください。
 - ・ 泳動後のゲルに気泡が生じ、デンシトメトリー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、スキャンニングしないでください。この部分には、残余の被染色物があるため測定の見害となります。
 - ・ デンシトメトリーする前に約 30 分放置しておく、HDL の直前に泳動されたアルブミンのシャープな屈折線および HDL₂、HDL₃ のダブルピークを消すことができます。(再現性の向上に役立ちます。)

〔参考〕

常光デンシトロン CR-20 を用いる場合の測定条件

スキャン距離	MANUAL (27~30mm)
ピッチ	10mm
フラクシオン感度	L
ゼロベース	1 ポイント
スパン	AUTO
フィルター	No.3 620nm

常光デンシトロン 20HR を用いる場合の測定条件

スキャン距離	27~30mm
ピッチ	10mm
フラクシオン感度	L
ゼロベース	3 ポイント
光源波長	赤 (660nm)

(8) 計算方法

カイロマイクロンの部分を除いて、VLDL、(IDL)、LDL、HDL の各分画値の合計を 100%として分画%を算出します。

VLDL と LDL の間に出現した IDL (ミッドバンド) は IDL 分画としてそのまま残すか、LDL 分画に入れて計算します。

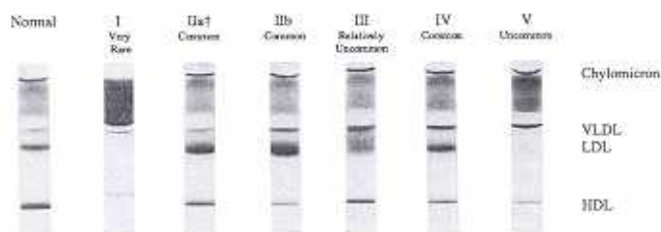
- ・ 泳動後のゲル管の保存はできません。大切な検体は、写真を撮っておいてください。どうしても数日間保存したい場合は、ビーカーにゲル管と蒸留水を入れ約 5 分間加熱して、その後、蒸留水中に保存します。急激な加熱をすると、ゲル管内に気泡が出ることがあります。

〔測定結果の判定法〕

ここに示す型判定の例は、米国の NHI(National Heart and Lung Institute)⁶⁾で確立された、Lipids Research Clinics Program に述べられているものです。

リポ蛋白ディスク電気泳動法は、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、これだけで型判定することはできません。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、抗ヘパリンリパーゼ測定、アポリポ蛋白定量等)などを考慮して判断してください。

LIPOPROTEIN PHENOTYPE PATTERNS*



このパターンは 1 例であり、標準ではありません。

ノーマルと 2a 型のパターンはよく似ています。血清コレステロール値や LDL コレステロール値から違いを判断してください。一般に 2a 型はコレステロール値が高くなります。同様に 2b 型と 4 型のパターンもよく似ていますので、コレステロール値から判断してください⁷⁾。マージナル 3 型(3' s)は超遠心法で確認する必要があります。肝臓や脾臓の機能障害、他の代謝不全症では血漿リポ蛋白に影響がおよぶことがあります。

○健常値
(参考値)

	VLDL	LDL	HDL
施設 A	男 5~20 女 4~17	44~69 42~65	22~50 26~53
施設 B	10.5~16.9	33.7~45.7	37.6~56.2

施設 A: ビー・エム・エル
施設 B: 東京警察病院⁸⁾

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. 同時再現性

	VLDL	LDL	HDL
X (%)	9.4	52.2	38.4
S.D.	1.64	0.88	1.18
C.V.	17.5	1.69	3.08

N=10

サンプル: リポトロール LOT No.50011

デンストメーター: デンシトロンマイコン 20

試験場所: (株)常光 東京技術研究所

2. 測定範囲

コレステロール値が 80mg/dL 以上あるヒトの血漿および血清

3. 相関性^{9,10)} (y: リポフォー x: 超遠心分離法)

VLDL	n=106 y=0.991x+3.397 r=0.995
LDL	n=122 y=0.999x-4.323 r=0.989
HDL	n=123 y=0.997x+1.280 r=0.845

〔使用上又は取扱い上の注意〕

- 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刺激性・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。
- 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。
- 本キットの有効期間は1年です。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。

- 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〕

- 貯蔵方法
2~8℃保存(凍結厳禁)
- 有効期間
製造後1年(使用期限は外箱に記載)

〔包装単位〕

100 回用 (コード番号: 12382)

〔必要な器具〕

光重合器 (50/60Hz)	(コード番号: 05340)
丸型ディスク電気泳動槽 PAV1200S	(コード番号: 05700)
	(コード番号: 03112)

〔主要文献〕

- 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
- Mcdona HJ, Ribeiro LP: Ethylene and Propylene Glycol in the Pre-staining of Lipoprotein for Electrophoresis, Clin Chem Acta, vol.4, 458-459, 1959
- 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
- Castell WP, et al.: HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease, Circulation, vol.55, No.5, 767-772, 1977
- Schwertner HS, Friedman HS: Changes in Lipid Values and Lipoprotein Patterns of Serum Samples Contaminated with Bacteria, Am J Clin Path, vol.59, 829-835, 1973
- Classification of Hyperlipidaemias and Hyperlipoproteinaemias, Bull, WHO, vol.43, 891-915, 1970
- 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
- 樹所久子, 三浦雄一他: 総合検診におけるリポ蛋白の分析, 第30回日本人間ドック学会誌, pp, 232, 1989
- Muniz, N.: Measurement of Plasma Lipoprotein by Electrophoresis on Polyacrylamide Gel, Clin.Chem., Vol.23, No.10, 1826-1833, 1977
- Roche D, et al.: Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Quantification of High-Density Lipoprotein Cholesterol, Clin Chem, Vol.31, No.11, 1893-1895, 1985

＊＊〔問い合わせ先〕

株式会社 常光 菊川工場 医薬品薬事品質保証部
静岡県菊川市西方154
電話 0537-36-1644 FAX 0537-36-2185

＊＊〔製造販売元〕



株式会社

常光

静岡県菊川市西方154
電話 0537-36-1644