肝疾患における血清 α -リポ蛋白の 修飾とその診断的応用

——とくに indocyanine green との結合パターンによる解析——

田 中 直 見 金 井 弘 一 織 田 敏 次*

はじめに

肝疾患で血清蛋白の質的ないし量的変化の生ずるであろうことは、肝が血清蛋白合成の中心的な場であることから十分に想像される。我々は、肝疾患における血清蛋白の質的变化を追求してきた¹⁾が、血清蛋白とくに α -リポ蛋白の色素結合能の変化から、肝病態の把握ならびに肝疾患の鑑別を試みた。

対象および実験方法

対象は急性肝炎 12 例、慢性肝炎 37 例、過栄養性脂肪肝 22 例、肝硬変症 34 例を含む 137 例である。

空腹時患者血清 1 ml と indocyanine green (ICG, 第一製薬), methyl orange (第一化学), sulfobromophthalein (BSP, 第一製薬) をそれぞれ試験管内で混合し, Sephadex G 200 によるカラムクロマトグラフィーを行った。カラムは直径 4 cm, 長さ 45 cm のものを使用し, 緩衝液は 0.1 M tris-HCl (pH 8.0) を用い, 20~40 ml/時の速度で流出する液を 5 ml ずつに分画採取した。実験は 4°C で行い, 溶出液は 280 nm の吸収率により蛋白, 465 nm で methyl orange, アルカリを加えて pH 12 以上にして 580 nm で BSP, 805 nm で ICG をそれぞれ測定した。

超速心法によるリポ蛋白分画は de Lalla & Gofman の方法²⁾を用い, えられた各分画について agarose agar 電気泳動 (Noble の方法³⁾), および脂質分析を行った。またリポ蛋白各分画に *in vitro* で ICG を混和し, 血清と同様に Sephadex G 200 によるカラムクロマトグラフィーを行った。総コレステロールは Zak Henley 法⁴⁾, 中性脂肪は Fletcher 法⁵⁾, 総磷脂質は Chen の変法⁶⁾でそれぞれ測定した。

図 1. 血清蛋白と各種色素の結合および Sephadex G 200 カラムクロマトグラフィーによる分析.
a: 正常 b: 肝硬変

成 績

Sephadex G 200 によるカラムクロマトグラフィーでは、血清蛋白は分子量の大きいものから 19 S, 7 S, 4 S と三つの山に分けられた (図 1)。色素のうちに methyl orange, BSP はおもに蛋白の 3 番目の山, すなわち albumin と結合しており, そのほか 1 番目に小さな山が認められたが, 正常と肝疾患の間にパターンの差はなかった (図 1-b)。ICG は三つの山にわかれ (分子量の大きいほうから peak I, II, III とする), peak I, III はそれぞれ蛋白の 19 S, 4 S の山に一致するが, peak II

* N. Tanaka, K. Kanai, T. Oda: 東京大学 第 1 内科。

図 2. ICG 量の変化と血清蛋白-ICG 結合パターン。
a: 正常 b: 肝硬変

は蛋白の 7S の山よりやや 19S のほうにずれているものが多い。しかも肝疾患では peak II が消失または減少している例が多くみられた (図 1-b)。

ICG の量を種々かえて蛋白との結合パターンの変化をみると、血清 1 ml にたいし ICG が 5 mg, 0.5 mg では ICG のピークは三つ存在するが、ICG の量を 0.05 mg まで下げると、おもに 19S と結合することが認められた (図 2-a)。肝疾患で peak II が消失している例では、ICG の量をかえてみても peak II は出現しなかった (図 2-b)。

また 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) についても検討したが、tris-HCl (pH 8.0) をもちいた場合と異なり、肝疾患での peak II の減少はほとんど認められなかった。

図 3. 急性肝炎の病期と血清蛋白 ICG 結合パターンの変化。

a: 第 5 病日 b: 第 28 病日 c: 第 49 病日

直径 1 cm, 長さ 120 cm のカラムを用い、血清 0.2 ml を加えても蛋白と ICG との結合パターンには変化がなく、操作を 4°C でなく室温で行っても温度差による相違はみられなかった。

次に各種肝疾患の代表的なパターンを示す。

急性肝炎の病期による血清蛋白の ICG 結合パターンの変化は図 3 に示すとおりである。図 3-a は病極期のもので、peak II は完全に消失しているが、回復期にはいると peak II が若干出現し (図 3-b)、完全に回復した時期のもの (図 3-c) では peak II は正常パターンを示している。肝硬変症、原発性肝癌では図 4 のとおりで、いずれも peak II が消失しているが、この二つの疾患の間にはパターン上の差はない。慢性肝炎は図 5-a に示すように、peak II は消失しないしは減少する例が多いが、過栄養性脂肪肝は図 5-b に示すように全例正常パターンを示した。

超遠心法によってえられた chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), residue (蛋

図 4. 肝疾患と血清蛋白-ICG 結合パターン
a: 肝硬変 b: 原発性肝癌

図 5. 肝疾患と血清蛋白-ICG 結合パターン
a: 慢性肝炎 b: 過栄養性脂肪肝

白分画)の各分画と ICG を混合し, Sephadex G 200 によるゲル濾過を行うと, 図 6, 7 に示すような結合パターンがえられた。

図 6 にみられるように, 正常血清では ICG の peak I はおもに VLDL, LDL と, peak II は HDL と, peak III は albumin とそれぞれ結合している。肝疾患で peak II が消失している例では, 図 7 のように HDL は 19 S の位置に移動していた。19 S の位置にみられた HDL を agarose agar 電気泳動によって分析してみると, 電気泳動上はやはり α -lipoprotein の性質をもっているのがわかる (図 8)。

超遠心法によってえられた各分画の脂質分析結果は表 1 に示すとおりである。

考 案

In vitro での血清蛋白と色素の結合性については従来からしばしば研究されてきたが, 臨床的にはあまり応用されていない。Kusunoki (1953)⁷⁾ は電気泳動により求めた A/G 比に比べて, methyl orange を使用して測定した A/G 比が重症肝疾患において低下すると報告した。

Janecki (1970)⁸⁾ は *in vitro* で血清と ICG を混合し, Sephadex G 200 カラムクロマトグラフィーにて分画した試料の蛋白と ICG の結合パターンにより, 急性肝炎の病態をある程度把握できるとした。我々も Janecki らと同様に, Sephadex G 200 を用い, 臨床診断に応用する目的で各種肝疾患患者血清の分析を行った。

色素は methyl orange, BSP, ICG を用いたが, 肝疾患で peak II に変化の認められることから, ICG がもっとも鋭敏に肝の病態を反映すると思われる。消失した peak II が ICG の量を増加しても出現しなかったことは, 結合パターンの変化が蛋白と ICG との量的不均衡によるものではなく, 肝疾患において, 血清蛋白になんらかの変化が生じることによって, peak II と結合していた蛋白が消失したか, あるいは蛋白の色素結合能が失われたためと考えられる。小さなカラムを用いても, あるいは室温で実験を行っても十分な再現性を認めたことは, この方法の臨床的応用を容易にするものと考えてよい。

Phosphate buffer (0.01 M, pH 7.2) を用いると, peak II の変化が少なくなり, したがって肝疾患による

図 6. 正常血清リポ蛋白各分画と ICG 結合. Sephadex G 200 カラムクロマトグラフィーによる分析

図 7. 肝硬変血清リポ蛋白各分画と ICG 結合. Sephadex G 200 カラムクロマトグラフィーによる分析.

表 1. 血清リポ蛋白の脂質分析

	超遠心法による分画	総コレステロール	総磷脂質	中性脂肪
正 常	VLDL	15.4%	21.8%	62.8%
	LDL	50.3	36.4	13.3
	HDL	41.1	48.6	10.3
慢性肝炎	VLDL	20.7	27.6	51.7
	LDL	49.1	28.9	21.9
	HDL	38.0	50.4	11.6
脂 肪 肝	VLDL	24.0	23.0	53.0
	LDL	46.4	37.9	15.6
	HDL	43.2	45.2	11.6
肝 硬 変	VLDL	24.2	27.3	48.5
	LDL	37.6	35.9	26.5
	HDL	31.5	52.1	16.4

差も認めにくくなる。この点から、我々は tris HCl (0.1 M, pH 8.0) を用いて実験を行ったが、これに関しては、phosphate buffer を用いると慢性活動性肝炎で peak II の増加をみるという報告⁹⁾もあり、今後の検討にまち

図 8. 肝疾患で 19S にみられた HDL の agarose agar 電気泳動像。

たい。

次に臨床例について述べてみたい。

Peak II が急性肝炎極期に消失し、回復するにつれて出現することは、肝硬変、肝癌などにみられる peak II の消失とも考えあわせると、これはある種の肝細胞障害

を反映するようにみえる。ことに進行した肝硬変で肝機能検査上はよく安定していても, peak II がまったく認められない症例が多い事実は, この考えを支持する。

過栄養性脂肪肝では, トランスアミナーゼが異常値をとるものも含めてすべて peak II は正常パターンを示したことに我々とはとくに興味をもっている。一方, 慢性肝炎ではその大多数に peak II の異常がみられ, 我々がしばしば診断に苦しむ慢性肝炎と脂肪肝の鑑別の一助になる可能性がある (図5)。ただ慢性肝炎の一部, とくに非活動性のものでは正常パターンに近いものがあり, この点に関しても今後検討を続けねばならない。

次に peak II の消失する原因と関連して ICG 結合蛋白について検討してみたい。ICG は anionic dye の一つであり, 血中では血清蛋白と結合して肝に運搬されるとされ, 結合蛋白としては, アルブミン¹⁰⁾, α_1 -リポ蛋白¹¹⁾, などがあげられている。我々は超速心法によりえられたリポ蛋白各分画と ICG を試験管内で混合し, Sephadex G 200 でカラムクロマトグラフィーを行い, ICG の peak I は主に VLDL と LDL, peak II は HDL, peak III はアルブミンとそれぞれ結合しており, ICG の量が少ないときはほとんど 19 S (VLDL, LDL) と結合していることを確かめた。肝疾患で ICG の peak II が消失する例では, HDL が 19 S の位置に移動しており, 19 S に移動した HDL は agarose agar 電気泳動では α -リポ蛋白の性質をもっている。脂質分析の結果を HDL について正常と肝硬変で比べてみると, 正常に比べて総コレステロールがやや低下し, 総磷脂質と中性脂肪が増加している。

以上の成績から, ICG の peak II が消失するのは蛋白の色素結合能が低下したためではなく, peak II の結合蛋白である HDL がなんらかの修飾をうけた結果として, 19 S に移動したため, 肝疾患でみられる ICG の peak II の変化には, HDL が中心的役割りを果たしていると思われる。 α -リポ蛋白がどのような修飾をう

けたかについて, 現在追求中である。

結 語

肝疾患における血清蛋白の質的变化を色素との結合能によって解明する目的から, 血清と ICG を試験管内で混合し, Sephadex G 200 によるカラムクロマトグラフィーを行い, 蛋白と ICG の結合パターンの分析を行い, 次の結果を得た。

- 1) 肝疾患の多くに peak II の異常が認められ, これはある種の肝の病態を反映する。
- 2) 過栄養性脂肪肝は, peak II の正常パターンを示し, 脂肪肝の除外診断に役立つ可能性を示唆する。
- 3) Peak II の変化は, high density lipoprotein がなんらかの修飾を受けたために, peak I の位置に移動することによって起こるものと考える。

脂質分析に協力していただいた東大第1内科内藤周幸博士に感謝の意を表する。

文 献 1) 金井弘一: 日内会誌 54: 57, 1965.

2) de Lalla, O. & J. W. Gofman: Glick's method of Biochemical Analysis, vol 1, 1954, Inter science, N. Y.

3) Noble, R. P.: J. Lip. Res. 9: 693, 1968. 4) Zak, B.: Amer. J. Clin. Path. 27: 583, 1957. 5) Fletcher, M. J.: Clin. Chim. Acta 22: 393, 1968.

6) Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, H.: Anal. Chem. 28: 1756, 1956. 7) Kusunoki, T.: J. Bioch. 39: 349, 1953.

8) Janecki, J. & Krawczyński, J.: Clin. Chem. 16: 1008, 1970. 9) 神坂和明ほか: 第58回日本消化器病学会総会口演, 1972.

10) Cherrick, G. R.: J. Clin. Invest. 39: 592, 1960.

11) Baker, K. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 957, 1966.

* * * * *