電気泳動を用いたアポ蛋白分析*

PBC（原発性胆汁性肝硬変）患者の異常リポ蛋白について

古賀俊逸**・宮田康司**

はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, 以下 PBC) ではしばしば高脂血症が観察され、黄色腫を伴う著しい高脂血症を呈することもある。例えば Dickson ら¹⁾によると、83例の症候性 PBC 患者と21例の無症候性 PBC 患者の血清総コレステロールの平均値はそれぞれ377mg/dl と285mg/dl であったと報告されている。PBC 患者のリポ蛋白異常として広く知られているものにリポ蛋白 X (LP-X) の出現²⁾があるが、その他に α リポ蛋白の異常がしばしば指摘されている³⁻⁶⁾。

PBC 患者の異常 α リポ蛋白についてはその性状など十分な検討が行われておらず、不明確な点が多い。すなわち、先に述べた各報告者が指摘する異常リポ蛋白が同一のものであることを証明する直接的な根拠に欠けている。このためわれわれは PBC 患者の異常 α リポ蛋白につき詳細な性状分析を試みた⁵⁾。その中で特に各種の電気泳動を応用したアポ蛋白分析がその性状決定に極めて有効な手段となり得たので、その概要を報告する。

対象および方法

対象は当科およびその関連病院に入院した PBC 患者10名とした。症例は全例女性であり年齢は33~70歳であった。PBC の診断は臨床症状、血液生化学的検査、抗ミトコンドリア抗体 (AMA) の検索、腹腔鏡、肝生検所見などを総合して行った。アルカリ性フォスファターゼ (ALP) と γ -GTP 活性は全例において異常高値を

示しており、総ビリルビン値は5例で上昇が認められた。AMA は全例陽性であり、8例の患者では肝生検による組織学的診断を行った。

各患者より早期空腹時に採血を行い、血清を分離後以下の各測定に供した。

1. 超遠心法によるリポ蛋白分離

超遠心浮上法により超低比重リポ蛋白 (VLDL, $d < 1.006\text{g/ml}$), 低比重リポ蛋白 (LDL, $d, 1.006 \sim 1.063\text{g/ml}$), 高比重リポ蛋白 (HDL, $d, 1.063 \sim 1.21\text{g/ml}$) を分離した⁷⁾。分離した各リポ蛋白は0.05%の EDTA-2Na を含む0.9%食塩水 (pH7.0) で十分に透析を行い、脂質およびアポ蛋白の分析に供した。

一部の症例についてはゾーナル超遠心法によるリポ蛋白分離を行った。方法の詳細は別に記した⁸⁾。本法によるリポ蛋白分離では LDL から HDL₂, HDL₃ への連続的な分離が可能であり、異常リポ蛋白の分析には特に有用であった。

2. 電気泳動法によるリポ蛋白分析

通常のリポ蛋白電気泳動はアガロース電気泳動法により行った。支持体には Pol E Film (日本商事 KK) を用い、0.05M ベロナール緩衝液 (pH8.6) で150V, 45分間の通電を行った。泳動終了後、固定、染色 (Fat Red 7B) を行い、デンシトメトリーで各リポ蛋白分画の比率 (%) を求めた。

LP-X の定量は既報の寒天電気泳動法⁹⁾により行った。支持体には1% Bacto-Agar (0.05M ベロナール緩衝液, pH8.6で作製) を用い、試料を塗布後同じ緩衝液を用いて100V, 90分間の電気泳動を行った。泳動終了後、寒天板は0.6%硫酸デキストラン溶液に浸して

* Electrophoretic analysis of abnormal lipoproteins and their apoproteins in patients with primary biliary cirrhosis.

** Shunichi Koga, Yasuji Miyata, 九州大学医学部第三内科。

Table 1. Levels of serum lipids, lipoprotein X and LCAT activities in PBC patients

Case	TC (mg/dl)	FC (mg/dl)	EC/TC	PL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LCAT (nmole/ml/hr)	LP-X (mg/dl)
1	345	98	0.71	476	65	70	20
2	816	660	0.19	1610	141	nd	1873
3	232	63	0.73	254	73	146	0
4	157	54	0.66	246	107	72	256
5	357	186	0.48	526	152	nd	683
6	183	47	0.74	227	53	nd	0
7	295	111	0.62	371	116	39	684
8	266	88	0.67	340	150	92	0
9	257	53	0.60	326	90	46	0
10	295	91	0.69	319	312	nd	0
Mean ±S.E.	321±59	145±59	0.61±0.05	470±130	126±23	78±16	
Normal range	150~250	50~80	0.65~0.80	140~245	50~150	55~110	0

TC, Total cholesterol; FC, Free cholesterol; EC, Esterified cholesterol; PL, Phospholipids; TG, Triglycerides; LCAT, Lecithin: cholesterol acyltransferase; LP-X, Lipoprotein X.
nd, not determined.

LP-X bandを確認し、同部を切り出し塩酸に溶解後、コレステロール量を酵素法で定量した。LP-X量はLP-X中のコレステロール含量を25%として計算した。

3. アポ蛋白分析

分離したリポ蛋白分画中のアポ蛋白分析はテトラメチル尿素で脱脂¹⁰⁾した後、その可溶性アポ蛋白についてポリアクリルアミド電気泳動法(PAGE)により分析した。SDS-PAGEはWeberとOsbornの方法¹¹⁾に従って0.1%のSDSを含む15%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。尿素-PAGEは8 mole/lの尿素を含む7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った¹²⁾。

4. アポ蛋白定量

アポ蛋白A-I, A-II, B, C-III, Eはヒト血清より各々のアポ蛋白を精製し、ウサギを免疫して作製した自家抗血清を用いて、ロケット免疫電気泳動法により測定した^{13~17)}。アポ蛋白C-IIは一元免疫拡散法(C-II測定用免疫プレート, 第一化学KK製を使用)にて測定した。

5. その他の測定

総コレステロール, 遊離型コレステロール, トリグリセリド, リン脂質はいずれも市販の酵素法キットにより測定した。LCAT活性は長崎, 赤沼らの方法¹⁸⁾により測定した。蛋白質の定量はウシ血清アルブミンを標準にしてLowry法¹⁹⁾により行った。

成 績

10名のPBC患者の脂質分析の結果をTable 1に示した。総コレステロールおよびリン脂質は7例の患者で増加しており、特に遊離型コレステロールの増加が顕著であった。LP-Xは5名の患者で観察されたが、特に遊離型コレステロールが100mg/dl以上を示した症例ではLP-Xが多量に存在していた。LCAT活性は6例の患者で測定を行ったが、4例は正常範囲内にあり2例で低下が認められた。

リポ蛋白のアガロースゲル電気泳動法による分画の結果は、Fig. 1およびTable 2に示した。観察を行った10例のPBC患者全例においてpre β リポ蛋白が認め

Table 2. Lipoprotein electrophoresis on agarose gel

Case	α -lipoprotein	Slow α -lipoprotein (%)	Pre β -lipoprotein	β -lipoprotein
1	28.5	44.5	0	27.5
2	9.6	8.6	0	81.8
3	20.2	29.4	0	50.4
4	40.6	0	0	59.4
5	19.5	20.7	0	59.9
6	44.7	0	0	55.1
7	29.7	22.3	0	48.0
8	24.5	26.1	0	49.3
9	49.4	14.9	0	35.6
10	38.6	18.2	0	43.2
Mean $\pm$ S.E.	30.5 $\pm$ 4.0	23.1 $\pm$ 3.4	0	51.0 $\pm$ 4.7
Normal range	30~42	0	13~25	38~50

Fig.1. Serum lipoprotein patterns by agarose gel electrophoresis. Note the appearance of slow α -lipoprotein in the PBC patient.

られず, slow α 位に異常リポ蛋白を認めるものが8例あった。また, α リポ蛋白は低下傾向にあるものが多かった。

超遠心法でリポ蛋白を VLDL, LDL, HDL の3分画に分離し, その各分画につきアガロース電気泳動法で

検討してみると, この異常リポ蛋白(電気泳動での性状より以後 slow α リポ蛋白, slow α -LP と呼ぶ)が LDL と HDL の両分画にわたって存在していることが示された (Fig. 2)。

次に, 1例の PBC 患者につきそのリポ蛋白の分布像をゾーナル超遠心法で連続的に観察した (Fig. 3)。その結果, PBC 患者の HDL では通常の HDL₃に相当する peak は認められず HDL₂領域に1つの大きな peak が観察された。この PBC 患者の HDL は正常の HDL₂の peak よりも密度が低い部分に大部分が認められており, この部分に異常リポ蛋白の存在が推定できた。

さらに, この異常リポ蛋白 (slow α -Lp) の性状を検討するため, 超遠心法で得られた各分画のアポ蛋白構成につき PAGE 法で検討を行った。PBC 患者の LDL 分画には正常 LDL には認められない A-I, A-II, C-II, C-III, E などのアポ蛋白が明確に認められた (Fig. 4)。また, HDL 分画においても PBC 患者では多量のアポ E が認められた (Fig. 5)。さらにこのアポ蛋白異常を先に述べたゾーナル超遠心の HDL 分画 (Fig. 3 の A, B, C の各分画) について検討してみると, アポ E の混在は密度のより低い分画でより顕著に認められ

Fig.2. Agarose gel electrophoresis of isolated lipoprotein fractions of a PBC patient. Slow α -lipoprotein was recovered in both the LDL and HDL fractions.

Fig.3. Subfractionation of HDL by rate zonal ultracentrifugation. Elution profile of a PBC patient is illustrated by a solid line. The broken line shows the elution profile of a healthy subject. Note disappearance of HDL₃ peak and a shift of HDL₂ peak to a lesser density region in the PBC patient. Broken line in the middle indicates the density gradient.

た (Fig. 6).

血漿アポ蛋白濃度の測定を行った成績は Table 3 に示した. 血清アポ A-I 濃度は7/10例で正常ないし軽度上昇を示しており, 3/10例で低下を認め, その平均値は $107 \pm 11 \text{ mg/dl}$ であった. 一方, アポ A-II 濃度は全例で低下を示し, 平均値は $20 \pm 2 \text{ mg/dl}$ で有意の

Fig.4. Apolipoprotein in the LDL fraction of a PBC patient, analyzed by SDS- and urea-PAGE.

低下を示した. またアポ蛋白 B 濃度は1/9で増加, 4例で低下を示し, 平均値は $62 \pm 8 \text{ mg/dl}$ であった. アポ C-II 濃度は8/10例で上昇しており, うち5例では著明に上昇を示しており, その平均値は $7.8 \pm 1.3 \text{ mg/dl}$ で有意の上昇を認めた. アポ C-III 濃度は5/9例で低下, 2例で増加を認め, 平均値は $9.6 \pm 2.4 \text{ mg/dl}$ であり低下するものが多かった. また, アポ E 濃度は9/10例で増加ないし著明増加を示し, 平均値は $26.3 \pm 6.3 \text{ mg/dl}$ で, 有意の増加を示した.

考 案

PBC 患者では胆汁うっ滞による高脂血症が認められる. 本患者の高脂血症の特徴はリン脂質と遊離コレステロールが主として増加することであり, これらの異常は既に発黄以前に認められる. PBC 患者のリポ蛋白異常としてはリポ蛋白 X (LP-X) の出現が有名であるが, 近年, アポ蛋白分析法の著しい進歩に伴いリポ蛋白異常をアポ蛋白面より詳細に検討することが可能になった. われわれはこのような新しいアポ蛋白分析法を応用して, PBC 患者の異常リポ蛋白の解析を試みた.

PBC 患者の異常リポ蛋白としてまず注目された点は slow α -Lp の出現である. これは今回検討した10例

Fig.5. Apolipoproteins in HDL fraction of a PBC patient. Note the appearance of apo E in the HDL fraction from the PBC patients (SDS-PAGE). An additional band in the top region of both gels is the result of albumin contamination.

Fig.6. Apolipoprotein composition of HDL subfraction of a PBC patient. A, B and C correspond to the fraction shown in Fig 3. Content of apo E increased as density of fraction was lowered.

中 8 名の患者で観察されており、その出現率は LP-X の出現率 (10 例中 5 例) より高い。Slow α -Lp は Lauterberg らが報告している α_1 -LDL³⁾ や Watanabe らによる Slow HDL⁶⁾ と同様のものと考えられる。Lauterberg らの報告によると、 α_1 -LDL が PBC 以外の患者で観察されることは極めて稀であり、また、われわれが検討した 15 例の閉塞性黄疸患者においても slow α -Lp は 1 例の患者においても観察することができなかった。

肝胆道疾患患者に観察される異常リポ蛋白としてアポ E-rich HDL がある²⁰⁾。同様な異常リポ蛋白は家族性 LCAT 欠損症患者の血漿中にも認められており²¹⁾、肝疾患患者において出現するアポ E-rich HDL も LCAT 活性低下により nascent HDL が血中にう

っ滞した結果と考えられている。

PBC 患者の slow α -Lp とアポ E-rich HDL との異同に関しては、現時点では明らかでない。Slow α -Lp はアポ E-rich HDL と同様にリン脂質と遊離コレステロールの含量が高いと考えられ⁵⁾、また後に述べるごとくアポ E 含量が高いというアポ蛋白構成面での特徴を有している。しかし、PBC 患者では LCAT 活性は一般的にあまり低下しておらず、また、PBC 以外の胆汁うっ滞症患者では slow α -Lp を認め得なかったことなど、slow α -Lp が PBC に特有の異常リポ蛋白である可能性を示す所見も得られている。ただし、PBC 以外の肝胆道疾患において slow α -Lp の血中濃度が PBC ほど高くなく、今回検討したアガロース電気泳動法では検出できていない可能性があり、今後の課題としたい。

Table 3. Levels of serum apoproteins in PBC patients

Case	A-I	A-II	B	C-II (mg/dl)	C-III	E
1	141	25	49	11.8	14.5	74.3
2	31	4	103	13.6	26.9	34.2
3	102	14	64	2.5	6.3	11.4
4	83	22	47	4.2	2.7	7.4
5	111	20	72	10.3	8.7	19.4
6	119	22	23	2.3	5.5	10.0
7	85	nd	74	10.3	7.2	31.8
8	113	26	75	6.4	6.9	16.2
9	160	26	47	10.3	7.4	37.1
10	125	25	nd	6.6	nd	21.2
Mean ±S.E.	107±11	20±2*	62±8	7.8±1.3*	9.6±2.4	26.3±6.3*
Controls	120±4 (n=36)	30±1 (n=20)	78±5 (n=18)	2.8±0.2 (n=12)	10.0±0.4 (n=40)	6.3±0.5 (n=13)

Control values are expressed as mean±S.E. ng, not determined.

*Differs significantly from controls ($p<0.01$).

PBC 患者の slow α -Lp の特徴は、その密度が正常の HDL より低く LDL より高いこと、アポ蛋白構成面からアポ E の含量が高いこと、などである。このことは血漿中のアポ E 濃度の測定を行うと、PBC 患者においてはアポ E 濃度が極めて高値であるという特徴的所見として表現されていた。アポ E は肝臓で合成されるアポ蛋白であり、重症な肝障害ではその血中濃度が低下するが、急性肝炎や胆汁うっ滞症では増加することが多い²³⁾。しかし、PBC 患者でのアポ E 濃度の増加はさらに著しく、その平均値は急性肝炎患者のアポ E 濃度の約 2 倍に達していた。

結 語

PBC 患者のリポ蛋白異常として LP-X の出現の他に slow α -Lp の出現が特徴的であることを述べた。LP-X は PBC 以外の胆汁うっ滞でも観察されるが、slow α -Lp は PBC 以外の胆汁うっ滞症では観察できなかった。この slow α -Lp の特徴をアポ蛋白分析により検討してみるとアポ E 含量の高いリポ蛋白である

ことが証明された。このようなリポ蛋白異常の検討にはアポ蛋白分析が極めて有用であり、さらには血漿アポ蛋白濃度の定量的測定も脂質代謝異常の病態解明に有用であることを示した。

文 献

- 1) Dickson, E.R. et al : Popper, H., Schaffner, F. eds. Progress in Liver Diseases, vol. VI, Grune and Stratton, New York, 1979, p. 487.
- 2) Seidel, D. et al : J. Clin. Invest., **48** : 1211, 1969.
- 3) Lauterberg, B.H. et al : Gastroenterology, **74** : 1053, 1978.
- 4) Etienne, J. et al : Biomedicine, **29** : 33, 1978.
- 5) 宮田康司他 : 肝臓, **25** : 54, 1984.
- 6) Watanabe, M. : Acta Med. Okayama, **33** : 269, 1979.
- 7) 古賀俊逸 : リポタンパク, 初版, 中外医学社, 東京, 1980, p.13.

- 8) 莊野哲朗他：生物物理化学, **25** : 18, 1981.
- 9) 古賀俊逸他：臨床検査, **23** : 231, 1979.
- 10) Kane, J.P. : Anal. Biochem., **53** : 350, 1973.
- 11) Weber, K., Osborn, M. : J. Biol. Chem., **244** : 4406, 1969.
- 12) Koga, S. et al : Biochim. Biophys. Acta, **236** : 416, 1971.
- 13) 古賀俊逸他：生物物理化学, **19**, 151, 1975.
- 14) 古賀俊逸他：生物物理化学, **20**, 49, 1976.
- 15) 山本匡介他：生物物理化学, **23**, 71, 1979.
- 16) Fujii, S. et al : Clin. Chim. Acta, **115** : 321, 1981.
- 17) 宮田康司他：動脈硬化, **12** : 47, 1984.
- 18) Nagasaki, T., Akanuma, Y. : Clin. Chim. Acta, **75** : 371, 1977.
- 19) Lowry, O.H. et al : J. Biol. Chem., **193** : 265, 1951.
- 20) Sabesin, S.M. et al : Adv. Intern. Med., **25** : 117, 1980.
- 21) Mitchell, C.D. et al : J. Lipid Res., **21** : 625, 1980.
- 22) 宮田康司他：肝臓, **24** : 167, 1983.