〔原 著〕

5% disc PAGE により測定した HDL-cholesterol 亜分画

池 田 裕

SUMMARY

The cholesterol concentrations in the subfractions of high-density lipoprotein (HDL) were measured by means of 5% disc polyacrylamide-gel electrophoresis (PAGE). The cholesterol in lipoproteins separated from whole serum according to particle size by PAGE were stained by an enzymic method and were subjected to densitometry. Although the cholesterol in chylomicron, very low-, intermediate- and low-density lipoproteins did not entered into the 5% separating gel, three major subfractions of the cholesterol in HDL (HDL-C) were sharply recognized in the gel and were named fast HDL-C, mid HDL-C and slow HDL-C, from the anodic side, respectively. Another subfraction of HDL-C appeared behind the slow HDL-C in patients with acute hepatitis and obstructive jaundice, and was named upper HDL-C. Apolipoprotein (apo) A-I was detected in all subfractions of HDL-C. ApoA-I in the particles of the upper HDL-C consisted of only free apoA-I with pre- β mobility in the crossed immunoelectrophoresis, that is, apoA-II was absent in the same particles. The apoA-I/apoA-II ratio in the mid HDL-C particles was higher than that in the fast HDL-C particles. The fast HDL-C particles also contained apoC-II and apoC-III but no apoE. The mid HDL-C particles contained apoE together with apoC-II and apoC-III. The slow HDL-C particles contained apoE but no apoC. The upper HDL-C particles contained apoB-100 but not contained apoC or apoE. The approximate molecular weight of the particles of the subfractions was 180×10^3 for the fast HDL-C particles, 250×10^3 for the mid HDL-C particles, 410×10^3 for the slow HDL-C particles and 540×10^3 for the upper HDL-C particles. The profile of the subfractions of HDL-C obtained from a patient with cerebral infarction was characterized by the significant reduction in slow HDL-C and mid HDL-C, being reflected in the reduction of HDL-with apoE. The profiles obtained from patients with acute hepatitis or obstructive jaundice were characterized by the significant reduction in fast HDL-C, by the increase in slow HDL-C and by the appearance of upper HDL-C. These findings suggested that fast HDL-C, mid HDL-C and slow HDL-C are the cholesterol in HDL₃, the cholesterol in HDL_{2a} and the cholesterol in HDL_{2b}, respectively.

Key words: subfractions of HDL-C, upper HDL-C, HDL_{2b}-C, HDL_{2a}-C, HDL₃-C, PAGE

緒 言

高比重リポ蛋白質 (HDL) が抗動脈硬化的役割を果た

しており、そのコレステロール (HDL-C) は抗動脈硬化的指標として評価されてきた¹⁾。近年、HDL が構造的にも機能的にも heterogeneous なリポ蛋白質であること

The subfractions of the cholesterol in high-density lipoprotein determined by 5% disc polyacrylamide-gel electrophoresis.

Hiroshi Ikeda; 全晃会内科

Correspondence address: Hiroshi Ikeda, Internal Medicine, Zenkokai, Niwashirodai 1-30-4, Sakai 590-01, Japan.

略号一覧 PAGE: polyacrylamide-gel electrophoresis, HDL-C: cholesterol in high-density lipoprotein (受付 1993年4月21日, 受理 1993年6月11日)

から、これを細分画に分析して HDL 代謝研究や臨床応用に供されている。超速心法によって、HDL は 1.063~1.125 g/ml の HDL₂ と 1.125~1.210 g/ml の HDL₃ に分画されるが、さらに HDL₂ は HDL_{2b} (1.063~1.100 g/ml) と HDL_{2a} (1.100~1.125 g/ml) に細分画されている²⁾。ところで、電気泳動法による細分画に際しては、polyacrylamide (PA) ゲル濃度を連続的に増加させて pore size をしだいに小さくすることで節効果を強め、粒子の大きさで分析する方法、つまり gradient gel electrophoresis (GGE) が採用されてきた^{3,4)}。Anderson ら³⁾は、4~30% の濃度勾配をもつ市販の平板型垂直ゲルに HDL 分画試料を電気泳動して 3 分画に分離し、それぞれが超速心法で分析した HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL₃ であることを示した。今回著者は、5% の均一濃度の円柱 PA ゲルを用いた PA gel disc electrophoresis (disc PAGE) によって、血清試料から直接に HDL 亜分画中のコレステロールを、換言すると、HDL-C の亜分画をゲル上に再現性よく分離して染色し、それぞれの濃度を測定する方法を開発した。その結果、HDL-C 亜分画は三つの主要な亜分画 (陽極側から fast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-C と仮称した) と、その陰極側に非常に薄い亜分画 (upper HDL-C と仮称した) として確認された。主要亜分画は、陽極側から粒子サイズの小さい順に、超速心法での HDL₃ のコレステロール (HDL₃-C) と HDL_{2a}-C と HDL_{2b}-C に相当すると考えられた。

方 法

A. HDL-C 亜分画測定法

I. 5% disc PAGE

1) 5% 分離ゲル作製

A 試薬 (Tris 36.6 g に 48 ml の 1 N HCl と 0.23 ml の TEMED を添加、精製水を加えて 100 ml にして、pH 8.9 に調整) の 2 容量と、C 試薬 (acrylamide 15 g と BIS acrylamide 0.735 g に精製水を加えて 100 ml) の 5 容量と、G 試薬 (ammonium persulfate 0.14 g/dl) の 8 容量の混合液を 5×80 mm のガラス管に入れ、注射針で水を重積して水平界面形成し室温で重合固化。上部の水を除く。

2) 濃縮ゲルの重積

B 試薬 (Tris 5.98 g に 48 ml の 1 N HCl と 0.46 ml の TEMED を添加し精製水を加えて 100 ml, pH 6.7) の 1 容量と、D 試薬 (acrylamide 20 g と BIS acrylamide 5 g に精製水を加えて 100 ml) の 1 容量と、E 試薬 (Riboflavin 4 mg/dl) の 1 容量と精製水 5 容量の混合液

から 0.2 ml を分離ゲル上に重積し、水を重積して水平界面形成して蛍光灯下で光重合固化。上部の水を除く。

3) 試料ゲルの重積

B 試薬・D 試薬・E 試薬と 20% sucrose の等容量宛の混合液と、これと等容量の血清試料とを混合し、その 0.2 ml を濃縮ゲル上に重積し、さらに泳動緩衝液 (Tris 3 g と glycine 14.4 g を精製水 1000 ml に溶解) で泳動管を満たし、光重合固化。

4) 電気泳動

ゲル管を disc PAGE 用電気泳動槽 (常光) の上部槽に接続し、上下槽に緩衝液を入れ、冷蔵庫内で泳動管 1 本につき 4 mA で通電。先行 albumin 帯が泳動管下端まで 1 cm に達すると終了する。

II. 乾熱処理

長注射針をゲル管壁に沿って挿入し、注水しながらゲル管を回転してゲルを水中に落とし、濃縮ゲルを切り離してから 12×100 mm の試験管壁に移し、斜位に架けて 80℃ の乾熱器に入れる。5 分後に取り出して室温で放熱し、冷蔵庫で冷却して染色操作に移る。

III. 総コレステロール (TC) 染色

不溶性ジホルマザン染色法⁶⁾による TC 染色酵素試薬液 (コーコレスト A, 日本ケミファ) の 0.5 ml をゲルに注ぎ、ゲルを転がして全面を湿らせ、密栓して冷蔵庫内で水平に保存。酵素液がゲルに浸潤した 8 時間後に 37℃ で 30 分 incubate する。余分の酵素液は 10% 酢酸で洗い出す。

IV. 固定・洗浄

ガラス管に 10% 酢酸を入れて酵素反応を止め、40 分後に数回水洗する。

V. HDL-C 亜分画濃度の計測

ゲルを 570 nm でデンストメトリー (Auto Scanner, Helena) する。ゲル背景に濁りが生じた際は亜分画ゲルを切り出して、泳動に供しないゲルを切断して亜分画を挟んでデンストメトリーした。各亜分画比に、リンタングステン酸 MgCl₂ 沈降法で分離した HDL について測定しておいた HDL-C 値を乗じて亜分画内 TC 濃度を求める。

B. 種々濃度の分離ゲル作製

3.75% PA 分離ゲルは A 試薬と C 試薬と G 試薬の混合比 1:2:5 として作り、4.68% ゲルは混合比を 2:5:9 として作製した。

C. HDL-C 亜分画測定値の再現性の検討

I. 同時電気泳動における再現性

HDL-C が 58 mg/dl の健康女性から得た血清試料を、

10本の5% PAゲルに同時に電気泳動した際のfast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-Cの測定値の変動係数(CV)を求めて評価した。

II. 5回電気泳動を繰り返した際の再現性

同時に作製した5% PAゲルを用いて、上記試料を5回電気泳動した際の、HDL-C亜分画測定値のCVを求めて評価した。

D. HDL-C 亜分画からのリポ蛋白質の回収

同一試料を同時にdisc PAGEに供し、1本のゲルをTC染色し、その淡黄色albumin帯と他の無染色ゲルのalbumin帯を一致させて並べて、染色亜分画に一致する部分を切り出した。切り出したゲルから電気泳動的に、蛋白質回収装置(マックスイールド, ATTO)を用いて透析膜を張った回収カップに蛋白質を回収した。最終容量は0.4 mlとし、脱塩操作(デザライザーI, ATTO)後に次の検査に供した。

I. 脂質構成比の分析

薄層クロマトグラフィーによって分別された脂質成分を、水素炎イオン化検出装置で定量的に自動分析するシンクログラフ⁷⁾によって分析した。

II. アポ蛋白質の検出

1) アポ蛋白質 A-I (apoA-I) と apoA-II の免疫電気泳動

Grabarの方法⁸⁾に準じて、0.06 M Barbitol 緩衝液を含有する1% agarose (LE, FMC) ゲル上に並列して作った試料孔へ、fast HDL-C 亜分画 (fast 亜分画) と mid 亜分画から回収した試料はそれぞれ0.008 mlを、抗原量が少なかったslow 亜分画とupper 亜分画から得た試料は2倍量を注入し、180 voltで60分間電気泳動して、側溝へ抗apoA-I抗血清と抗apoA-II抗血清を0.2 mlずつ交互に注入した。2日間incubateし、免疫沈降線以外は生理的食塩水に2日間浸けて除蛋白し、沈降線をCoomassie Brilliant Blue R-250で蛋白質染色した。

2) ApoA-I 連立・交差免疫電気泳動⁹⁾

Agaroseゲル電気泳動でpre- β 位に出現するapoA-I only particle¹⁰⁾を検出するために、Laurellの方法¹¹⁾を改良して既報⁹⁾のごとく行った。

3) ApoC-II, apoC-III, apoE, apoB-100の検出 Ouchterlony 法¹²⁾によるゲル内免疫拡散法を行った。

E. HDL 亜分画の分子量の推定

粒子の脂質を失わずに電気泳動し、またTC染色への障害を避けるためにSDSを含有しない5% disc PAゲルを用い、蛋白質変性剤や加熱による試料前処理を省略

した。High molecular weight protein kit (thyroglobulin: $MW=669 \times 10^3$, apo-ferritin: $MW=440 \times 10^3$, catalase: $MW=232 \times 10^3$, lactate dehydrogenase: $MW=140 \times 10^3$, bovine serum albumin: $MW=67 \times 10^3$; Pharmacia) も同様に血清試料と同時に泳動した。校正蛋白質を泳動したゲルはゲル管から取り出してCoomassie Brilliant Blue R-250で染色し、血清を泳動したゲルはTC染色し、albuminの位置に対する校正蛋白質およびHDL-C亜分画の泳動距離の比(相対距離)を計測した。校正蛋白質の相対距離を横軸に、分子量を縦軸にplotし、その結線上にHDL-C亜分画の相対距離をplotすることでその大略の分子量を推定した。

成 績

1. 乾熱処理効果

同じ血清試料を同時に5% disc PAGEに供し、1本のゲルは乾熱処理を省略し、別の1本は乾熱処理後にTC染色操作に移った際に、2時間後の比較では前者のゲルは無変化だが、乾熱処理をした後者では染色試薬のゲル内浸潤が明白であり、8時間後にincubateして比較すると後者のTC染色帯が前者のものよりも鮮明であった。

2. 分離ゲル濃度の選択

Fig.1のゲルNo.1は、3.75% PAゲルにSudan Black Bで脂質前染色した血清を電気泳動したりポ蛋白

Fig. 1. Selection of a suitable concentration of separating gel to determine subfractions of HDL-cholesterol.

A gel in lane 1 shows the fractions of lipoproteins (LP). Other gels show the subfractions of HDL-cholesterol (C). Sample is hyperbilirubinemic serum. Lane 1 and lane 2: 3.75% gel, Lane 3: 4.68% gel, lane 4: 5.0% gel, pb: pre- β LP, m: mid band, b: β LP, a: α LP, Y: yellow albumin, U: upper HDL-C, S: slow HDL-C, M: mid HDL-C, F: fast HDL-C.

質分画であり、これと同時に、No. 2 は 3.75% ゲルを用いて、No. 3 は 4.68% ゲルを用いて、No. 4 は 5% ゲルを用いて急性肝炎患者から得た高 bilirubin 血清を、それぞれ電気泳動後に TC 染色をした結果である。3.75% 分離ゲルを用いた場合、Sudan Black B による脂質前染色法では HDL 亜分画が得られないのに、TC 後染色法では超低比重リポ蛋白質 (VLDL)・中間比重リポ蛋白質 (IDL)・低比重リポ蛋白質 (LDL) の TC が、pre- β リポ蛋白質 (pre- β LP)・mid band・ β LP の位置に認められ、HDL の TC は陽極側から fast HDL-C・mid HDL-C・slow HDL-C と仮称した主要 3 亜分画と upper HDL-C として出現する。しかし、fast HDL-C が albumin 位の bilirubin 帯に接して分離できない。分離ゲル濃度を 4.68% にすると VLDL・IDL・LDL が出現しなくなるが、fast HDL-C は bilirubin 帯から完全に離れた。5% 分離ゲルでは亜分画がさらに sharp になる。よって、血清試料から HDL-C 亜分画を測定するには 5% PA ゲルが至適と考えた。

3. 試料の選択

健康女性 10 名から得た血清を試料とした場合と、その血清からリンタンゲステン酸 $MgCl_2$ 沈降法で得た HDL 分画を試料とした場合の HDL-C の主要 3 亜分画比は、fast HDL-C に関しては前者が $44.4 \pm 4.3\%$ で後者が $46.3 \pm 5.1\%$ であり、mid HDL-C に関しては前者が $37.1 \pm 5.2\%$ で後者が $36.6 \pm 4.2\%$ であり、slow HDL-C に関しては前者が $18.3 \pm 3.7\%$ で後者が $17.6 \pm 5.6\%$ であった。そして、前者と後者との間に、それぞれの亜分画比についての有意差を認めない。よって、HDL-C の主要 3 亜分画を測定する際に、5% PA ゲルを用いれば HDL のかわりに血清を試料としても差し支えないと考えた。

4. HDL-C 亜分画測定法の再現性

同時電気泳動に際しての fast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-C の測定値の CV は、それぞれ 3.2, 3.8, 3.8% であり、5 回電気泳動を繰り返した際の測定値の CV は、それぞれ 4.2, 4.6, 4.9% であった。

5. HDL 亜分画の脂質構成比

60 歳の健康女性例を Fig. 2 上段に示すが、fast 亜分画と mid 亜分画の脂質構成比に明らかな相違はないが、これらに比して slow 亜分画ではエステル型コレステロール (EC) の構成比が低い。同年齢肝癌末期患者血清 (TC=170 mg/dl, トリグリセリド (TG)=62 mg/dl, bilirubin=10.5 mg/dl) の分析を Fig. 2 下段に示すが、全亜分画での EC の構成比が健康例に比して低く、リン脂

Fig. 2. Lipids compositions in subfractions of HDL-cholesterol.

Fast, mid, slow and upper indicate the subfractions of HDL-C. Est Chol: esterified cholesterol, TG: triglycerides, PL: phospholipids.

質 (PL) の構成比が高い。とくに fast 亜分画と upper 亜分画での EC 構成比の低下が著しく、逆に TG の構成比が増高していた。

6. HDL 亜分画のアポ蛋白質構成

Fig. 3 上段は upper HDL-C 分画比が高い肝癌末期患者血清から回収した HDL 亜分画を試料として、抗 apoA-I 抗血清と抗 apoA-II 抗血清を用いた免疫電気泳動の結果であり、apoA-I 免疫沈降線は HDL 亜分画の全部から出現するが、apoA-II 免疫沈降線は upper 亜分画からは出現しない (矢印の部位に)。また、slow 亜分画からも認識できなかった例もあり、アポ蛋白質構成を括めた Table 1 には (±) と表示した。なお、apoA-I 免疫沈降線は agarose 電気泳動では pre- β 位と α 位に 2 本出現しているので、抗 apoA-I 抗血清を用いた交差免疫電気泳動により pre- β 位の apoA-I と α 位の apoA-I の比を定量的に観察した結果が Fig. 3 下段である。ApoC-II, apoC-III, apoE, apoB-100 の存在は Ouchterlony 法による免疫沈降線出現の有無で判断して Table 1 に示した。

7. HDL 亜分画の分子量の推定

Fig. 4 のゲル No. 1 と No. 8 は高分子量校正蛋白質を、No. 2 から No. 7 はさまざまな患者血清を同時泳動して、前者を蛋白質染色し後者を TC 染色した結果である。No. 7 は 0.1% SDS 含有ゲルを用いた結果で、TC 染色帯は出現しない。見かけの分子量として、fast 亜分

Fig. 3. Immunoelectrophoresis for apoA-I and apo-II (upper) and crossed immunoelectrophoresis for apoA-I in subfractions of HDL-cholesterol.

An arrow shows the absence of a immunoprecipitin against apo A-II. Upper, slow, mid and fast indicate the subfractions of HDL-C. a: α mobility, pb: pre- β mobility, O: the origin in the first dimensional electrophoresis, F: free apoA-I, B: bound apoA-I.

Table 1. The distributions of apolipoproteins in subfractions of HDL-cholesterol.

	A-I	A-II	B-100	C-II	C-III	E
upper	+	-	+	-	-	-
slow	+	(+)	-	-	-	+
mid	+	+	-	+	+	+
fast	+	+	-	+	+	-

(+)=+ or -

画が 180×10^3 , mid 亜分画が 250×10^3 , slow 亜分画が 410×10^3 , upper 亜分画が 540×10^3 と推定した。

8. HDL 亜分画の臨床的意義

Fig. 5 の左図は陳旧性脳硬塞患者血清から、右図は肝

Fig. 4. The approximate molecular weights of subfractions of HDL-cholesterol.

Lane 1 and lane 8 show the calibration proteins stained by Coomassie Brilliant Blue R-250. Lanes of 2, 3, 4, 5 and 6 show the subfractions of HDL-C but the subfractions did not appear in a gel of lane 7 which contained 0.1% SDS.

	Left	Right
total HDL-C (mg/dl)	36	36
fast HDL-C (mg/dl)	25.8	11.0
mid HDL-C (mg/dl)	8.0	14.2
slow HDL-C (mg/dl)	2.2	8.0
upper HDL-C (mg/dl)		2.5
upper HDL-C (mg/dl)		0.3

Fig. 5. The subfractions of HDL-cholesterol.

The left densitogram was obtained from a patient with cerebral infarction and the right was obtained from a patient with hepatic cancer.

癌末期患者血清から得た HDL-C 亜分画のデンストグラフであり、それぞれの亜分画内コレステロール濃度を下表に示した。脳硬塞例では mid HDL-C の著減が特徴的であり、肝癌末期例では fast HDL-C が著減する反面で slow HDL-C の増加と upper HDL-C の明白な出現が特徴的である。

考 案

超遠心法で分析した HDL は heterogeneous なリポ蛋白質分画であるため、さらに細かく 1.063~1.100 g/

ml の HDL_{2b}, 1.100~1.125 g/ml の HDL_{2a}, 1.125~1.210 g/ml の HDL₃ に分離されている。Anderson, Nichols らは密度勾配超遠心法で得た HDL 分画を比重ごとに 12 分画に分け、各分画を 4~30% GGE で泳動した結果、それぞれの泳動距離は高比重のものから順に大きくなっていて、総合的には 3 分画に大別できた²⁾。後に彼らは、これらの分画を HDL₃, HDL_{2a}, HDL_{2b} として示した³⁾。

HDL-C 測定法の一つに、cellulose acetate 膜を支持体にしたり¹³⁾、agarose ゲルを支持体にして¹⁴⁾電気泳動後、酵素法による TC 後染色をして α リポ蛋白質 (α LP) 分画の TC を HDL-C として計測する方法が知られている。しかし、著者も cellulose acetate (Helena) を用いて泳動後に TC, TG, PL を別々に後染色したが¹⁵⁾、 α LP の亜分画は認めなかった。浦田ら¹⁶⁾は既成の 3% PA ゲルを用いる市販の disc PAGE キット (LipoPhor system, Quantimetrix, USA) で電気泳動後に TC 染色をした結果、コントロール血清では単一であった α LP 帯が高脂血症患者血清では 2 本に分離したことから、これらを HDL₂ の TC (HDL₂-C) と HDL₃ の TC (HDL₃-C) としている。しかし、著者が対照血清を試料として自家製の 3% PA ゲルを用いて Tris-Glycin 緩衝液で disc PAGE を行い、TC 後染色をした結果では、ゲル上に pre- β LP (VLDL に相当), mid band (IDL), β LP (LDL) の TC 染色帯の他に、陽極側に 3 本の TC 染色帯を認めた。リタングステン酸 $MgCl_2$ による沈降法で得た HDL を試料としても、この 3 分画が出現したことから、これらを陽極側から順に fast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-C と仮称した。そして、周産期母子間には HDL-C 亜分画についての相関性がないことを報告した¹⁷⁾。今回の研究は HDL-C 亜分画測定法を臨床検査法として満足できるように、つまり、再現性よく、多数検体処理が可能な方法として確立するために行った。

Disc PAGE は原法⁵⁾に準じて作製した分離ゲル上に濃縮ゲルと試料ゲルを重積したが、試料ゲルの濃縮効果を省略すると染色帯が鮮鋭ではなくなる。分離ゲルが 3% または 3.75% の場合、VLDL・IDL・LDL への TC 分布と同時に HDL-C 亜分画が認められるが、fast HDL-C と yellow alb とが分離しない。4.68% ゲルや 5% ゲルの場合は荷電効果よりも分子篩効果のほうが優位となって、fast HDL-C は yellow alb から完全に分離する。つまり、脂質とアポ蛋白質の複合体である HDL の分析が、GGE の手法によらずとも 5% disc PAGE で十分に可能であった。しかも、VLDL・IDL・LDL が 5% 分

離ゲル中には泳動してこないために、血清試料から直接に HDL-C 亜分画を得ることができた。この方法で留意すべき点は、TC 染色液をゲル周の全域に均一に十分に浸潤させることであるが、この問題は著者が考案した乾熱処理操作で解決できたと思われた。乾熱処理後に室温で放熱する際に、試験管壁にゲルより蒸発した水分が結露し、ゲル容積の減少がわずかながら観察される。水分が減じたゲルは添加された TC 染色液を速かに吸収することが、無処理ゲルとの比較で明白であった。その結果、HDL 亜分画の TC 染色性が恒常的・均一的になったと思われ、事実、再現性テストの成績が満足できるものとなった。

肝胆道疾患では、fast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-C の主要 3 亜分画の他に、これらの陰極側に 1 または 2 本の淡い TC 染色帯が出現する。これを upper HDL-C と仮称した。これら亜分画中の TG も後染色できたが、PL の後染色の際には亜分画から広く拡散して染まった。そのために各亜分画からの回収物の脂質構成比 (Fig. 2) では PL の百分比が低値となった。対照では slow 亜分画での EC の構成比が低値であるが、肝癌例ではすべての亜分画の TC とくに EC の構成比が低く、ことに fast 亜分画と upper 亜分画での低下が著しく、その反面、TG の構成比が増大していた。

HDL-C 亜分画のアポ蛋白質構成は Table 1 に総括した。ApoA-I はすべての亜分画に分布したが、agarose ゲル免疫電気泳動により pre- β 位と α 位に分離できた (Fig. 3)。これは、Levy and Fredrickson が HDL 試料から発見した所見¹⁰⁾と一致し、 α 位のものは HDL に結合した bound apoA-I で、pre- β 位のものは apoA-I only particle with lipids と考えられており、free apoA-I と称されている。その血中濃度は高脂血症¹⁸⁾・腎不全¹⁹⁾・肝胆道疾患⁹⁾で増大する。各亜分画からの回収物について交差免疫電気泳動で定量的に観察すると、upper 亜分画ではすべてが free apoA-I で、slow 亜分画では大部分が free apoA-I であり、mid 亜分画と fast 亜分画にも認めた (Fig. 3)。ApoA-II は upper 亜分画には存在しないことが判明し、slow 亜分画でも detect できない症例も経験した。免疫沈降線の長さの比較で半定量的に、apoA-I/apoA-II 比は fast 亜分画よりも mid 亜分画のほうが大きい。免疫拡散法での検討で upper 亜分画に apoB-100 を認めたが、upper 亜分画の本質については、さらに症例を集積して検討すべきであろう。Slow 亜分画には apoE を認めたが apoC-II と apoC-III は認めない。Mid 亜分画には apoC-II と

apoC-III とともに apoE が存在したが, fast 亜分画には apoC-II と apoC-III は存在するが apoE は存在しなかった。ちなみに, Weisgraber and Mahley²⁰⁾は heparin-sepharose affinity chromatography によって HDL₂ を分析して, HDL₂-without apoE と HDL₂-with apoE と apoB-containing lipoprotein に分けられたとしている。

Fig. 5 に, HDL-C 濃度が同じでも基礎疾患によって HDL-C 亜分画の profile が異なることを示した。脳硬塞例では apoE 含有亜分画の TC すなわち slow HDL-C と mid HDL-C の著減が特徴的であるが, 肝癌例では fast HDL-C の減少と slow 亜分画比の上昇と upper 亜分画の出現が特徴的であった。ちなみに, 田中ら²¹⁾は高速液体 chromatography による分析で, 脳硬塞群では HDL₂-C も HDL₃-C も低下しているのに, 肝硬変群では HDL₃-C の低下が特徴的であると報告しており, 著者の agarose 免疫固定電気泳動による分析では, HDL-apoE は脳硬塞群では著減し²²⁾, 急性肝炎群では血清 apoE の大部分が HDL-apoE であった²³⁾。

HDL-C 亜分画の見かけの分子量を計測した結果, fast 亜分画が 180×10^3 , mid 亜分画が 250×10^3 , slow 亜分画が 410×10^3 , upper 亜分画が 540×10^3 と推定できた。以上の, 亜分画の脂質・アポ蛋白質構成の特徴と病態での変動, および, 見かけの分子量などから考察して, fast HDL-C は HDL₃-C であり, mid HDL-C は HDL_{2a}-C で, slow HDL-C は HDL_{2b}-C であろうと考えられた。

本論文要旨は第 43 回電気泳動学会総会で発表した。

文 献

- 1) Miller GJ, Miller NE. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease. *Lancet* 1975; I : 16-9.
- 2) Anderson DW, Nichols AV, Forte TM, Lindgren FT. Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1977; 493 : 55-68.
- 3) Anderson DW, Nichols AV, Pan SS, Lindgren FT. High density lipoprotein distribution. Resolution and determination of three major components in a normal population samples. *Atherosclerosis* 1978; 29 : 161-79.
- 4) Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665 : 408-19.
- 5) Ornstein L, Davis BJ. Disc-electrophoresis. Unpublished work (Printed by Distillation Products Ind, 1962).
- 6) 浦田武義, 鈴木義典, 櫻林郁之介, 河合 忠. β -hydroxysteroid-NAD(P)-oxidoreductase (CDH) による新しいコレステロール分画染色法についての研究. *生物物理化学* 1982; 26 : 140.
- 7) 植田 寛, 伊藤機一, 手嶋豊彦, 狩野元成, 只野寿太郎. シンクログラフによる血清脂質分析法の検討. *臨床検査* 1975; 19 : 639-43.
- 8) Grabar P, Williams CA. Methode immunoelectrophoretique d'analyse de melanges de substances antigeniques. *Biochim Biophys Acta* 1955; 17 : 67-74.
- 9) 池田 裕. 連立交差免疫電気泳動法で測定した急性肝炎患者と閉塞性黄疸患者の bound apoA-I と free apoA-I. *臨床病理* 1992; 40 : 429-34.
- 10) Levy RI, Fredrickson DS. Heterogeneity of plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest* 1965; 44 : 426-41.
- 11) Laurell CB. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal Biochem* 1965; 10 : 358-61.
- 12) Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of experimental immunology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 1973 : 1-39.
- 13) Cobb SA, Sanders JL. Enzymic determination of cholesterol in serum lipoproteins separated by electrophoresis. *Clin Chem* 1978; 24 : 1116-20.
- 14) Stein EA, McNeely S, Steiner P. Electrophoretic separation of high density lipoprotein cholesterol evaluated and compared with the modified lipid research clinic procedure. *Clin Chem* 1979; 25 : 1934-8.
- 15) 池田 裕, 前田次郎. 電気泳動によるリポ蛋白分画の酵素的脂質測定法に関する基礎的検討および虚血性心疾患における α リポ蛋白脂質と血清アポリポ蛋白 A の臨床的評価. *臨床病理* 1982; 30 : 1127-31.
- 16) 浦田武義, 杉山由枝, 山崎成子, 高木 康, 五味邦英. リポタンパク分画 (酵素による染色法). *Medical Technology 別冊電気泳動法のすべて*. 東京: 医歯薬出版, 1991 : 143-149.
- 17) 池田 裕, 前田次郎, 竹中 徹. 周産期母体血と臍帯血のリポ蛋白質の比較. *臨床病理* 1992; 40 (補冊) : 85.
- 18) Schonfeld G, Bailey A, Steelman R. Plasma, apolipoprotein A-I and A-II levels in hyperlipidemia. *Lipids* 1978; 13 : 951-9.
- 19) Neary RH, Gowland E. The effect of renal failure and haemodialysis on the concentration of free apolipoprotein A-I in serum and the implications for the catabolism of high-density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1988; 171 : 239-46.

(388) 生物物理化学

- 20) Weisgraber KH, Mahley RW. Subfraction of human serum high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography. J Lipid Res 1980; 21: 316-25.
- 21) 田中 明, 内村 功, 前沢秀憲, 岡崎三代, 大野佳美, 原 一郎. 高速液体クロマトグラフィーによる各種疾患患者の血清 HDL₂, HDL₃ コレステロール組成の分析. 動脈硬化 1981; 9: 157-61.
- 22) 池田 裕, 清水映二, 前田次郎, 虎谷佳幸, 坂本健一. 陳旧性脳硬塞患者における高比重リポ蛋白質のアポ E. 日老医誌 1987; 24: 561-6.
- 23) 池田 裕, 前田次郎. 急性肝炎患者における α_2 -apoE. 肝臓 1987; 28: 1539-43.

要 旨

GGE の手法によらずに 5% disc PAGE を応用して, HDL 亜分画の TC (HDL-C 亜分画) を血清試料から直接に分別測定する方法を確立した. 分離ゲル上に染色された三つの主要 HDL-C 亜分画を, 陽極側から fast HDL-C, mid HDL-C, slow HDL-C と仮称したが, 肝胆道疾患では slow 亜分画の後方にさらに upper HDL-C が出現する. 亜分画粒子の脂質・アポ蛋白質構成の特徴と病態での変動やみかけの分子量などを測定して考察すると, fast HDL-C は HDL₃-C であり, mid HDL-C は HDL_{2a}-C で, slow HDL-C は HDL_{2b}-C であると推測された.