〔シンポジウム：電気泳動による変性 LDL の分析と臨床的意義〕

In vitro における血清リポ蛋白変化の電気泳動法による分析

安原正善*・森脇貴美**・藤田誠一**・片山善章**・高木 康***・五味邦英***

SUMMARY

The stability of serum lipoproteins *in vitro* was described. Serial changes in the appearance of serum during 37°C heating were investigated. In agent-free serum samples, turbidity decreased 5 and 10 days after heating was started, but then serially increased. In V.E or EDTA added serum samples, there were no changes until 15 days after heating was started. Turbidity increased 20 days after heating was started. Serial changes in lipoproteins on polyacrylamide gel disk electrophoresis (PAGE) were investigated. The appearance of LDL subfractions, appearance of IDL, LDL shift to positive electrodes, and decrease in HDL were observed. When serial changes in lipid parameters were investigated, stable values were obtained in V.E or EDTA added serum samples. EDTA effectively prevented lipoprotein degeneration, suggesting that serum metals are closely involved in oxidation degeneration. It was also confirmed that serum lipoproteins showed findings other than oxidation degeneration *in vitro*.

Key words: lipoprotein, *in vitro* stability, polyacrylamide gel disk electrophoresis (PAGE), serum metals, oxidation degeneration.

はじめに

脂質は生体にとって不可欠な成分で、血液を介してリポ蛋白の状態で体内を輸送されており、リポ蛋白の量的異常を示す高脂血症は動脈硬化症の主たる危険因子の一つとしてよく知られている¹⁻¹¹⁾。血清脂質の変動はリポ蛋白の代謝に起因し、その重要性から、血清脂質、リポ蛋白、アポ蛋白についての測定が行われている¹²⁻¹⁴⁾。

一方、測定法については、自動分析装置の導入に伴い、測定精度は著しく改善されたが、リポ蛋白は複雑多様な粒子であるため、採血後における血清リポ蛋白の安定性の問題点が指摘されている。したがって、今回、*in vitro* における血清リポ蛋白の変化を、質的面からポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (PAGE) 法を用いて検討し、また、脂質代謝に関係のある生化学項目も同時に測定して、量的面からも検討した成績を紹介する。

実 験

試薬・装置

(1) PAGE

①リポ蛋白分析用 PAG ディスク・リポフォー：Lipo-

phor^{15,16)} (常光)

②LDL 亜分画分析用 PAG ディスク・リポプリント法：Lipoprint^{9,17)} (常光)

③リポ蛋白分画測定試薬—コレステロール測定試薬 (TC Stain)：コーコレスト・A (日本ケミファ)

④リポ蛋白分画測定試薬—トリグリセライド測定試薬 (TG Stain)：コートリグリ・A (日本ケミファ)

⑤定電流・電圧装置：MODEL AE-8750 (ATTO)

⑥デンシトメーター：CLINISCAN 2 (ヘレナ研究所)

(2) 生化学検査項目の測定試薬

①総コレステロール：ラボサーチ T-CHO [CE・COD・POD 法] (A & T)

②遊離コレステロール：デタミナ-FC [COD・POD 法] (協和メデックス)

③中性脂肪：ネスコート VL II TG [GK・GPO 法] (アズウエル)

④リン脂質：ダイヤカラーリキッド PL [PL-D・Ch-OD・POD 法] (小野薬品)

⑤遊離脂肪酸：ラボサット NEFA [ACS・ACOD 法] (シノテスト)

⑥HDL-コレステロール：デタミナ-L・HDL-C [硫酸

In vitro changes of serum lipoproteins by polyacrylamide gel disk electrophoresis.

* Masayoshi Yasuhara; 神戸掖済会病院臨床検査部

** Kimi Moriwaki, Seiichi Fujita, Yoshiaki Katayama; 国立循環器病センター臨床検査部

*** Yasushi Takagi, Kunihide Gomi; 昭和大学医学部臨床病理学教室

Correspondence address: Masayoshi Yasuhara, the Laboratory for Clinical Investigation, Kobe Ekisaikai Hospital, 1-21-1, Manabigaoka, Tarumi-ku, Kobe 655-0004, Japan.

第 52 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

化シクロデキストリン複合系) (協和メデックス)

⑦ LDL-コレステロール: コレステスト LDL (界面活性剤選択阻害法) (第一化学薬品)

⑧ アポ AI: アポ A-I オート・N「第一」[免疫比濁法] (第一化学薬品)

⑨ アポ B: アポ B オート・N「第一」[免疫比濁法] (第一化学薬品)

⑩ アポ C II: アポ C II オート・N「第一」[免疫比濁法] (第一化学薬品)

⑪ アポ E: アポ E オート・N「第一」[免疫比濁法] (第一化学薬品)

⑫ LDL 分画: BLF「栄研」II [比濁法] (栄研化学)

⑬ VLDL 分画: BLF「栄研」II [比濁法] (栄研化学)

⑭ Chylomicron 分画: BLF「栄研」II [比濁法] (栄研化学)

⑮ LPL: LPL エライザー「第一」[サンドイッチ ELISA 法] (第一化学薬品)

⑯ リパーゼ: カラーオートテストワコー「リパーゼ」[1.2 ジグリセリド-TOOS 法] (和光純薬)

CE: コレステロールエステラーゼ, COD: コレステロールオキシダーゼ, POD: ペルオキシダーゼ, GK: グリセロールキナーゼ, GPO: グリセロール 3 リン酸オキシダーゼ, PL-D: ホスホリパーゼ D, Ch-OD: コリンオキシダーゼ, ACS: アシル CoA シンセターゼ, ACOD: アシル CoA オキシダーゼ

(3) 生化学測定装置: TBA-80 FR (東芝ラボメディカル)

方 法

外来患者早朝空腹時の脂質異常者血清 3 例 (sample A, B, C) と 10 人の健常者プール血清 (normal sample) を用いた。血清分離直後を 0 日目 (当日) として PAGE の Lipophor 法と Lipoprint 法によるリポ蛋白分析および生化学検査 14 項目を同時に測定した。PAGE 後, Sudan Black B (SBB), 総コレステロール (TC)¹⁸⁾, 中性脂肪 (TG)¹⁸⁾ の 3 種類の染色を行って解析した。そして残りの血清を密封し, 37°C 恒温槽で加温して経日的に 5 日目, 10 日目, 15 日目, 20 日目に同様の測定を行った。また, 血清分離後の血清にリポ蛋白安定化剤であるビタミン E (V.E) と金属イオンのキレート剤である EDTA を添加し, リポ蛋白の安定化効果も検討した。この実験の安定化剤を入れていない条件を free と表現する。

結 果

1. Lipophor 法の精密度

本研究は Lipophor によるリポ蛋白分画が重要であるので, その精密度について検討した。VLDL, LDL, HDL

濃度の異なった 3 種類の患者血清を用い, $n=10$ で同時再現性を検討した。VLDL 分画平均値 18.73~51.30% で CV 値 3.86~8.26%, LDL 分画平均値 32.64~50.04% で CV 値 2.45~5.57%, HDL 分画平均値 16.06~31.22% で CV 値 5.01~9.96% と良好な結果を得, 本法での精密度を確認した。

2. 血清加温による PAGE のリポ蛋白の経日変化

血清の濁りの有無を観察することによって, いずれのリポ蛋白に異常があるかがわかる。Fig. 1 に示すごとく, normal sample の free は, 経日的に濁りを生じた。V.E は 10 日目まで EDTA は 15 日目まで変化がなかった。10 日目を比較すると, その濁りの程度は, free, V.E, EDTA の順であった。Sample A, B, C の free では, ともに 0 日目から濁りの程度が異なっているが, 10 日目で 3 例とも濁りがわずかに減少する。しかし 15 日目より再び濁りは増加した。同様に V.E, EDTA においても 10 日目にわずかに濁りの減少は認められるが, 0 日目から白濁している sample A, B, C では normal sample のように, V.E や EDTA の濁りの防止効果は明確に観察することは困難であった。Normal sample で free, V.E, EDTA を比較すると EDTA 添加が経日的な濁りの程度が少なく, 安定化の効果が認められた。

3. 血清加温による PAGE のリポ蛋白の経日変化

Lipophor の Sudan Black B 染色 (SBB Stain) は陰極より Chylomicron (CM), very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) に分画される^{15,16)}。Lipoprint では Fig. 2 に示すごとく, LDL が亜分画され, 陰極の VLDL から各亜分画までの泳動距離 (A) を VLDL から陽極の HDL までの距離 (B) で割る A/B を Rf 値と称す。Rf 値 (A_m/B) 0.10~0.25 を mid band と称し, リポ蛋白としては intermediate density lipoprotein (IDL) である。また, Rf 値 (A_l/B) 0.3~0.36 を large LDL, さらに陽極側に染色されている Rf 値 (A_s/B) 0.41~0.61 を small LDL と称している^{9,17)}。TC, TG Stain¹⁸⁾ では, ガラス管よりゲルを取り出し染色する。その際, 粗孔ゲルが外れ, SBB Stain と比較すると陰極側先端部の染色泳動像が異なる。したがって, CM は SBB Stain では粗孔ゲルから分離ゲルにかけて確認でき, TC, TG Stain では陰極側の先端部に認められる。結果を Fig. 3~10 に示す。

(1) Chylomicron (CM)

Normal sample, sample A, B, C のすべての染色法で認められる。経日的変化は, TG 染色において 5 日目, 10 日目でわずかに減少し, 20 日目には染色帯が弱くなっている。Free, V.E, EDTA を比較すると, free に比べ V.E, EDTA は, 経日的な染色帯は弱かった。

Fig. 1. Sequential changes of quality in each samples.

Fig. 2. Relative position (Rf) of the intermediate lipoprotein midbands and LDL lipoprotein subfraction using Lipoprint system.

(2) VLDL および IDL

SBB Stain については、0 日目は 4 種類の sample とともに VLDL が明確に認められており、染色度は sample B, C が強かった。TC, TG Stain については、normal sample (Fig. 7) でも TC Stain において VLDL コレステロールが認められる。Sample A, B, C も TC, TG Stain で VLDL コレステロールは明らかに確認できる。Sample A, B, C は normal sample に比較して、VLDL 分画の染色度が強く、濃度が高いことが示唆される。特に、TG

Stain で sample C の CM, VLDL 分画が強く染色された。IDL については、sample A, B, C とともに弱い染色帯が認められるが、Lipoprint では sample A, B において明らかに認められる。それらの変化は、経日的に明確になっていくことが確認できた。また、normal sample では、Lipoprint で free の IDL が 10 日目で出現し、20 日目では free, V.E, EDTA にも認められた。

(3) LDL

LDL の SBB Stain は、4 種類の sample とともに free, V.E, EDTA において 0 日目より明らかに確認できる。泳動距離も free, V.E, EDTA とともに異なることなく泳動されている。TC Stain は幅広い染色帯が得られるが、陽極側の濃い染色帯が主要 LDL コレステロール染色帯と考えられ、4 種類の sample とともに 0 日目で free, V.E, EDTA とともに同じように染色されている。TG Stain においても染色度は弱いだが、同様の結果が得られた。これらの経日変化は SBB Stain において 4 種類の sample とともに、Lipophor で 10 日目には free, V.E, EDTA の順で陽極側に移動し、その後さらに陽極側に移動した。Lipoprint では 5 日目に free に LDL 亜分画が出現し、その後 15 日目に V.E, EDTA でも同様な LDL 亜分画が確認された。20 日目で

Fig. 3. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for Sudan Black B after Lipophor and Lipoprint disk electrophoresis (—: normal sample).

Fig. 4. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for Sudan Black B after Lipophor and Lipoprint disk electrophoresis (—: sample A).

は free, V.E, EDTA とともに LDL 分画はブロード状となった. TC, TG Stain においても経日的に LDL-TC, LDL-TG の染色帯は陽極へ移動し, SBB Stain とほぼ同様の結果が得られた.

(4) HDL

いずれの染色法の free, V.E, EDTA においても 0 日目より明確にシャープな染色帯が認められる. 経日変化はいずれの sample においても free は染色度が弱くなり, 15 日目からはさらに低下する. TC, TG Stain においても同様の結果となった. また, sample A, B, C いずれの染色においても 10 日目以後, V.E や EDTA に比べ free の染色度が著しく弱かった.

4. 血清加温による脂質およびアポ蛋白の経日変化

脂質のうち明らかに変化が認められるのは Fig. 11 に示すごとく, F-CHO, TG および FFA である. F-CHO は 4 種類すべての sample で経日的に増加し, 特に free でその変化が大きかった. 一方, T-CHO はすべての sample とも free, V.E, EDTA でも変化は認められなかった. TG についてはいずれの sample でも経日的に減少し, 特に sample A, B, C の free の 15 日目以後大きく減少が認められた. 20 日目になると free はさらに減少したが, V.E と EDTA はそれに比べるとわずかであった. 一方, FFA は TG の減少に伴って経日的に増加した. その増加は, TG と対称的であった. HDL-C, LDL-C の変化につ

Fig. 5. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for Sudan Black B after Lipophor and Lipoprint disk electrophoresis (—: sample B).

Fig. 6. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for Sudan Black B after Lipophor and Lipoprint disk electrophoresis (—: sample C).

いては本法の測定原理がホモジニアス法で、リポ蛋白の変性によって影響を受けるため、free は経日変化が認められる。しかし、リポ蛋白の安定化剤の可能性として検討した V.E, EDTA を添加した場合の効果は HDL-C については sample A, LDL-C については 4 種類の sample とともに認められた (Fig. 12)。アポ蛋白については、いずれの sample とともに経日安定性に関して、V.E や EDTA の効果が認められた。Free については、APO-B はわずかに上昇しているものの同様に安定性が認められた。しかし APO-AI, CII, E は経日変化が認められた (Fig. 12, 13)。

以上、V.E, EDTA は VLDL, CM を除いて大部分の脂質検査項目測定の安定化剤になることが判明した。しか

も、37°C 保温における条件であるから、もっと長期に安定性が保持されることが推定される。また、0 日目の各種脂質検査項目の測定値を Table 1 に示す。Sample A, C が高カイロミクロン血症で、sample B は VLDL が高値であった。Sample B は LDL も高かった。TC は sample A において高値を示し、LDL-C も高値であった。LPL は蛋白量としては 4 種類とも差はないが、lipase 活性は sample B, C が異常値であった。Lipase 活性測定に用いた原理は、基質としてであるので、一応 TG 加水分解の指標として考えられる。アポ蛋白は、LDL, LDL-C が高値であるため、B が高値であり、sample C は、CM が高値であるので CII, E が高値となっている。Sample B については、

Fig. 7. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for TC and TG after Lipophor disk electrophoresis (—: normal sample).

Fig. 8. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for TC and TG after Lipophor disk electrophoresis (—: sample A).

B, CII, E が正常範囲をわずかに超える程度であった。

考 察

我々は“*in vitro*における血清リポ蛋白の変化”をPAGEで検討した。その結果、各リポ蛋白に経日的変化が血清の外観やPAGE泳動像に認められた。Sample A, B, Cが5, 10日目に濁りが減少するのは、Fig. 13に示したように経日的にCMが減少していることが起因していると推定される。V.E, EDTA添加の効果については、normal sampleにおいて、5日目、10日目にTG染色のCM画分の染色度が安定化剤を添加しないfreeで弱くなっている。このことは、血清外観の変化でもEDTAは濁

りが遅延していることにも現れている。また、Fig. 12に示したようにCMの構成アポ蛋白のB, CIIの安定性にV.E, EDTAが効果的であることから明らかである。血清の濁りに関しては、各sampleの経日的変化でV.E, EDTAがわずかに遅延していることは、Fig. 13に示したようにCMの安定性が確保されているからである。VLDLの経日変化に対するV.E, EDTAの効果については、明確な成績は得られなかったが、Fig. 3に示したようにLipoprintにおけるnormal sampleのIDL (Rf値0.10, LDL Rf値0.10~0.25)の出現はfreeでは10日目に出現するが、V.E, EDTAでは認められず、20日目ではV.E, EDTAでも認められる。Sample A, B, Cは

Fig. 9. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for TC and TG after Lipophor disk electrophoresis (—: sample B).

Fig. 10. Time course changes in serum lipoprotein levels determined by staining for TC and TG after Lipophor disk electrophoresis (—: sample C).

free, V.E, EDTA とともに 0 日目より IDL が認められる (Fig. 4~6). このことは *in vitro* における VLDL から IDL への移行を V.E, EDTA が抑制しているのか, 物理化学的に VLDL の安定性を確保しているのかは明らかでない. Table 1 示したように, sample A, B, C の TG 値はそれぞれ 333, 343, 599 mg/dl であり, sample A, C は CM 由来, sample B は VLDL 由来の TG である. また, lipase 活性はそれぞれ 59, 133, 247 U/l である. このことから, IDL の 0 日目の SBB Stain, TG Stain の染色帯の強度は sample B が強く, sample A, C は弱い. TG Stain の sample C の 5 日目において free で HDL 付近の陽極側に新たな染色帯が出現している. これは CM

の lipase による未知 HDL (原始 HDL) かもしれない. また, 20 日目には SBB Stain, TG Stain とともに CM は減少しており, それは Fig. 11 に示したように, FFA が増加していることから, lipase による CM-TG が分解することと合致している. V.E, EDTA は CM を保護し, lipase が作用しにくくなっていることも推定される. これらのことは, ヒトリポロテインリパーゼを添加して確認する必要がある. LDL の V.E, EDTA 効果は normal sample と sample A の free において, 5 日目にはすでに陽極側に染色帯が移動しているが, V.E, EDTA では認められない. この LDL の陽極側への移動は, 4 種類の sample とともに Lipophor において, 10 日目には free, V.E, EDTA

Fig. 11. Sequential changes in lipid items (T-CHO, F-CHO, TG, PL, FFA) in respective samples.

の順で起こり、Lipoprint では5日目の free において、LDL 亜分画が出現し、V.E, EDTA は変化の遅れが認められた。HDL に対しても V.E, EDTA は安定化効果があると考えられる。

まとめ

1. 37°C 加温による血清外観の経日的変化は

- 1) Free では5日目、10日目で一時濁りが減少し、その後経日的に濁りは増す。
- 2) V.E や EDTA では15日目まで変化なく、20日目で増加した。

2. PAGE によるリポ蛋白の経日変化については

- 1) 経日的に free, V.E, EDTA の順に LDL の亜分画が出現する。
- 2) VLDL に近接して IDL が出現するが、V.E, EDTA 添加では free に比較して遅延する。
- 3) LDL の経日的な陽極側への移動があり、V.E, EDTA 添加では free に比較して遅延する。
- 4) TG Stain の CM からの未知 HDL 染色帯 (HDL 画分よりわずかに陽極側に泳動される) は、free で出現しやすく、V.E, EDTA にもわずかではあるが、経日的に認められる。

- 5) Free, V.E, EDTA 添加の有無にかかわらず、HDL は経日的に消失する傾向にあった。

3. 脂質項目の経日変化は

- 1) Free では F-CHO の増加が認められたが、V.E や EDTA では安定していた。
- 2) Free では、TG が徐々に低下し、15日目以後著減するが、EDTA は経日的に減少するものの、量的には少なかった。
- 3) Free での FFA の経日的な生成は、濃度的に TG 低下と対等ではないが、TG と F-CHO より FFA に対応している。一方、V.E や EDTA におけるわずかな増加は、TG の減少にほぼ対応している。
- 4) V.E, EDTA は CM, VLDL を除いて 37°C 保温における脂質検査項目測定安定剤になる。CM, VLDL は 37°C で5日間であるから、実用的な 25°C ではもう少し経日的に安定性が保持できると思われる。
- 5) HDL-C は free, V.E, EDTA の添加の有無にかかわらず、徐々に低下する。
- 6) V.E や EDTA の LDL-C は安定しており、free での減少は LDL の酸化変性による測定法への影響と思われる。
- 7) APO-AI, CII, E の V.E や EDTA での経日的な減

Fig. 12. Sequential changes in lipid items (HDL-C, LDL-C, APO-AI, APO-B, APO-CII) in respective samples.

Fig. 13. Sequential changes in lipid items (APO-E, LDL, VLDL, Chylomicron) in respective samples.

Table 1. Serum lipoprotein levels at 0 day.

	Normal Sample	Sample A	Sample B	Sample C	Reference Interval	Unit
CM	22	583	349	996	0~30	mg/dl
VLDL	77	46	215	27	50~150	mg/dl
LDL	621	1393	749	631	230~450	mg/dl
TC	206	363	239	216	120~220	mg/dl
TG	99	333	343	599	30~150	mg/dl
HDL-C	56	37	51	50	31~84	mg/dl
LDL-C	130	262	129	82	88~158	mg/dl
LPL	22	23	32	35	PHP(138~321)	ng/ml
Lipase	9	59	133	247	7~60	U/l
AI	144	110	150	168	122~161	mg/dl
B	119	236	138	116	69~105	mg/dl
GII	2.4	2.0	5.4	8.4	1.6~4.2	mg/dl
E	4.2	5.2	6.6	8.4	2.7~4.5	mg/dl
Type	—	III	IV	I	—	—
Turbidity	(-)	(2+)	(1+)	(3+)	(-)	—

少は、HDL の減少に関係している

- 8) Free でのリポ蛋白は、酸化、変性、小粒子化が起こりやすく、脂質項目の測定値に影響することが考えられる。
- 9) 血清リポ蛋白の 37℃加温によるリポ蛋白変性の防止効果は、EDTA が特に優れていた。
- 10) *In vitro* におけるリポ蛋白に対する V.E と EDTA の主な作用は、前者は抗酸化作用で後者は金属キレート作用であり、EDTA は特に優れたリポ蛋白変性防止効果が認められ、血清中の金属類が酸化変性に大きく関与していることが示唆された。また同時に、*in vitro* において血清リポ蛋白は、酸化変性以外にも変化することも確認された。

文 献

1) 内藤博邦, 平野 勉. 糖尿病性腎症における低比重リポ蛋白の粒子サイズと脂質組成. *Diabetes Frontier* 1996; 7: 94-7.

2) 山村 卓, 豊田康嗣. 高トリグリセライド血症と small dense LDL. *Pharma Medica* 1996; 4/7: 70-9.

3) 山村 卓. 血清リポ蛋白代謝と動脈硬化惹起性リポ蛋白. *臨床検査* 1996; 40/9: 997-1007.

4) 奎野浩司, 山田信博. 高アポ B 血症と小形高密度 LDL. *循環科学* 1993; 13/6: 568-72.

5) 内藤博邦, 平野 勉. 低比重リポタンパクの粒子サイズは糖尿病性腎症で小型化する. *糖尿病* 1995; 38/8: 615-24.

6) 戸塚光哉, 宮下 洋. 糖尿病合併症における Fas β リポ蛋白の意義. *糖尿病* 1997; 48/8: 503-10.

7) Temel kova-Kurktschiev T, Hanfeld M. Small dense low-density lipoprotein (LDL) in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Impact of hypertriglyceridemia. *Ann NY Acad Sci* 1997; 827: 279-86.

8) Campos H, Genst JJ. Jr, Blijevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1992; 12/2: 187-95.

9) Crouse JR, Park JS, Schey HM, Kahl FR. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease. *J Lipid Res* 1985; 26: 566-74.

10) Kwiterovich PO. Jr, Hyperapo B. A pleiotropic phenotype characterized by dense low-density lipoproteins and associated with coronary artery disease. *Clin Chem* 1988; 34/8(B): B 71-7.

11) Musliner TA, Krauss RM. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem* 1988; 34/8(B): B 78-83.

12) 脂質検査のすべて. *Medical Technology* 1980; 8/12. 医歯薬出版. 東京.

13) Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.

14) Fisher WR. Heterogeneity of plasma low density lipoproteins manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism* 1983; 32/3: 283-91.

15) Muniz N. Measurement of plasma lipoproteins by electrophoresis on polyacrylamide gel. *Clin Chem* 1997; 23/10: 1826-33.

16) Roche D, Atager V, Le Quang NT, Girard A, Ekindjian OG. Polyacrylamide gel electrophoresis in quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31/11: 1893-65.

17) Rajman I, Kendall MJ, Cramb R, Holder RL, Salih M, Gammage MD. Investigation of low density lipoprotein subfractions as a coronary risk factor in monotriglyceridemic men. *Atherosclerosis* 1996; 125: 231-42.

18) 浦田武義, 高木 康. 脂質分別測定法 (前固定・後染色法). *Medical Technology* 1997; 25/10: 1005-14.

要 旨

In vitro における血清リポ蛋白の安定性について報告する。37℃加温による血清外観の経日変化は、free では5日目、10日目で濁りが減少し、その後、経日的に濁りは増す。一方、V.E や EDTA では15日目まで変化なく、20日目で増加した。PAGE によるリポ蛋白の経日変化については、LDL 垂分画の出現、IDL の出現、LDL の陽極への移動、HDL の減少が認められた。脂質項目の経日変化は、V.E と EDTA で安定した値が得られた。EDTA は良好なりポ蛋白変性防止効果が認められ、血清中の金属類が酸化変性に大きく関与していることが示唆された。また同時に、*in vitro* において血清リポ蛋白は、酸化変性以外にも変化することも確認された。