

## 電気泳動法によるリポ蛋白分画測定の基礎的検討

永瀬 澄香<sup>1</sup>, 河口 勝憲<sup>2</sup>, 佐藤 彰一<sup>1</sup>

### A Study of Lipoprotein Analysis by Electrophoresis

Sumika NAGASE<sup>1</sup>, Katsunori KOGUCHI<sup>2</sup> and Syoichi SATO<sup>1</sup>

キーワード：リポ蛋白, 電気泳動法, カイロミクロン, Pre $\beta$ -リポ蛋白,  $\beta$ -リポ蛋白,  $\alpha$ -リポ蛋白

#### 概 要

今回, アガロースゲル電気泳動法によるリポ蛋白分画測定の検討を行った。泳動条件は, 検体塗布量 4 ~ 5  $\mu$ l, 泳動時間30分, 固定時間5分, 脱色時間5 ~ 7分, 染色時間7分が最適であると考えられ, 染色液の保存期間は3週間までは測定可能であった。この条件下で測定した結果, 同時再現性において, 比較的良好な成績を得ることができた。

また, 検体保存の影響について検討した。室温保存では, 変性が著しく測定可能な保存期間は2日間であった。冷蔵保存では, 徐々に pre- $\beta$  リポ蛋白の減少が見られ, 測定できるのは4日以内であると判明した。冷凍保存では, 14日間の保存でも大きな変化はみられなかったことから, 長期保存に適していると思われる。リポ蛋白検査では, 脂質の量的異常だけでなく, リポ蛋白の質的異常も見出すことを目的としているため, 検体の保存の方法には十分注意する必要があると考えられた。

本実験に用いた BECKMAN 社製 Paragon リポ蛋白分画測定法は, 各分画の分解能も優れており, リポ蛋白分画を学生実習に導入するにあたり, 適した方法だといえる。

#### はじめに

脂質は生体にとって不可欠な成分であり, 各臓器のエネルギー源として, また, 細胞膜の構成成分やホルモンの前駆体として重要である<sup>1)</sup>。血清脂質成分には, コレステロール, トリグリセリド(TG)やリン脂質(PL)がある。これらの脂質は疎水性が強く水に溶けにくい<sup>2)</sup>ため, 水と油の両方に親和性のある蛋白質(アポ蛋白)に結合し, 水に馴染みやすい安定なリポ蛋白を形成して血液中に存在する。

リポ蛋白の基本構造は, きわめて強い疎水性を示す TG とコレステロールエステル(EC)が中心に位置し, その外殻には両親媒性の PL, 遊離コレステロール(FC)が一層の単分子層で覆い, さらにアポ蛋白が表層脂質に結合する形を成している<sup>2,3)</sup>。

このリポ蛋白にはいくつかの種類があり, 各リポ蛋白

は比重, 荷電, 粒子サイズ, 脂質とアポ蛋白の組成比などが異なる不均一な粒子群である。各分画のリポ蛋白は起源, 機能, 構成成分が異なり種々の障害により変化するため, リポ蛋白分画を測定することで脂質代謝異常の病態や原因の解析に利用される。脂質代謝異常の中でも高脂血症は日常診療でよくみられるもので, 高脂血症がどのような状態で起こったのか見極める必要がある<sup>4)</sup>。したがって, 脂質検査で総コレステロール(TC)やTGなどの脂質代謝異常が見られたら, つぎにどのリポ蛋白に異常があるのかを知る必要があり, リポ蛋白分画の測定が重要になってくる。

現在, 附属病院中央検査部においては, リポ蛋白分画測定は外注検査のため, 実施されていない。我々は, 臨床検査科の学生実習において, リポ蛋白分画測定を体験させることが必要であると考えている。今回, 電気泳動法によるリポ蛋白分画測定のため BECKMAN 社製 Paragon LIPO を学生実習に導入するにあたり, 測定条件の設定や検体の保存方法などについて, 基礎的検討を行ったので報告する。

#### 1. リポ蛋白測定法

血清中リポ蛋白の比重による分類法として超遠心分

(平成14年10月21日受理)

<sup>1)</sup>川崎医療短期大学 臨床検査科, <sup>2)</sup>川崎医科大学附属病院 中央検査部

<sup>1)</sup>Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, Kawasaki Medical School Hospital

離法が用いられ、リポ蛋白の分類の基準となっている。リポ蛋白は組成の違いによって比重が異なり、5つに分類されている。カイロミクロン、超低比重リポ蛋白 (VLDL)、中間比重リポ蛋白 (IDL)、低比重リポ蛋白 (LDL)、高比重リポ蛋白 (HDL) がそれである。

また、リポ蛋白は脂質とアポリポ蛋白の複合体であるため、各分画の荷電による易動度の違いによって判別することができる。その方法として、主にアガロース電気泳動法が用いられ、泳動位置により  $\alpha$ -リポ蛋白 (HDL)、pre $\beta$ -リポ蛋白 (VLDL)、 $\beta$ -リポ蛋白 (LDL)、カイロミクロン {塗布原点} に分類される。

その他、粒子サイズによる分類法であるポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE 法) やカラムクロマトグラフィー法 (HPLC 法を含む)、沈殿法などがある<sup>5)</sup>。これらの測定法の中で、簡単にリポ蛋白の質的異常を知る方法として電気泳動法 (リポタンパク分画) が挙げられる。

今回、アガロース電気泳動法によるリポ蛋白分画の測定法について検討を行った。

## 2. 実験方法

### 1) 電気泳動原理

電場にあるリポ蛋白が、荷電の違いにより、陰極または陽極のいずれか一方に移動する性質に基づいている。陽極側より  $\alpha$  リポ蛋白 ( $\alpha$  分画)、pre- $\beta$  リポ蛋白 (pre- $\beta$  分画)、 $\beta$  リポ蛋白 ( $\beta$  分画)、カイロミクロン (原点) の順に分画測定される (図 1)。

### 2) 検体、試薬および装置

- ① 検体：健常検体 (低濃度) …健常人新鮮血清  
異常検体 (高濃度) …市販異常管理血清ネスコール A
- ② 支持体：アガロースゲル 0.5%、バルビタールバッファ 0.1%
- ③ 試薬：
  - ・泳動バッファ … B-2 バルビタールバッファ (pH 8.6, 0.05 イオン強度)
  - ・染色液 … リポ蛋白染色液 (0.07% ズダンブラック B 色素)
  - ・固定液 … 使用アルコール 180ml, 脱イオン水 90ml, 氷酢酸 30ml (使用アルコール → 5% メタノール : 95% エタノール = 1 : 19 に混合したもの)
  - ・脱色液 (I, II, III) … 45% メタノール
- ④ 泳動装置：BECKMAN 社製泳動装置
- ⑤ デンシトメーター：島津 CS 9300 PC デンシト

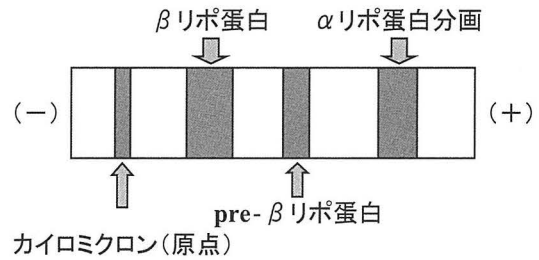


図 1 リポ蛋白分画図

メーター

### 3) 電気泳動の方法

- ① パラゴン電気泳動槽の陽極・陰極側にそれぞれ B-2 バルビタールバッファ 45ml を注入する。
- ② リポ蛋白測定用のゲルを取り出しペーパータオルの上に置き、ゲルプロッター (薄いろ紙) で軽く乾燥する。
- ③ サンプル塗布テンプレートをゲルの上に置き、穴に沿って検体を一定量 (5  $\mu$ l) 注入し、5 分間放置する。
- ④ テンプレートプロッターを用いてテンプレートを軽く拭く。
- ⑤ ゲルの“+”と“-”が電極に一致するようにパラゴン電気泳動層に入れ、出力を 100V で 30 分間泳動する。
- ⑥ 泳動完了後、ゲルを固定液中に 5 分間浸す。
- ⑦ ゲルを固定液から取り出し、ゲルの裏側の余分な水分を拭き取りドライヤーで完全に乾燥させる。
- ⑧ 乾燥したゲルを以下の溶液で順次処理する。
  - リポ蛋白染色液：7 分間
  - 脱色液 (I, II, III 槽共に 45% メタノール使用)
    - I 槽：3 回, II 槽：3 回, III 槽：7 分間脱色
- ⑨ 処理後、ゲルの裏側の余分な水分を拭き取り、ドライヤーで完全に乾燥させる。
- ⑩ ゲルを肉眼で観察し、デンシトメーターを用いて 630 nm でスキャンする。

### 4) 実験の検討項目

- (1) 泳動条件についての検討
  - ① 血清塗布量, ② 泳動時間, ③ 固定時間, ④ 脱色時間, ⑤ 染色時間, ⑥ 染色液の保存期間
- (2) 同時再現性について
  - ① 単一ゲルにおける同時再現性
  - ② ゲル別同時再現性
- (3) 検体保存によるリポ蛋白分画への影響
  - ① 室温保存, ② 冷蔵保存, ③ 冷凍保溫

### 3. 結果および考察

#### 1) 泳動条件について

{使用アルコール}

使用アルコールには、染色性が最も優れていたメタノール添加95%エタノールを用いて泳動条件の検討を行った。

##### (1) 血清塗布量の検討

健常検体血清と異常検体血清を1 $\mu$ l~5 $\mu$ lの5種類に塗布量を変えて泳動した。1 $\mu$ l・2 $\mu$ lは塗布量が少ないためバンドが薄く、3~5 $\mu$ lは泳動分離されていたが、5 $\mu$ lがよりpre- $\beta$ 分画がシャープに分かれるためよいと思われる。今回の実験では5 $\mu$ lを最適として用いた。

##### (2) 泳動時間

泳動時間を20分、25分、30分、35分、40分と変えて泳動し、その泳動距離を測定した。 $\alpha$ リポ蛋白~原点および $\alpha$ リポ蛋白~ $\beta$ リポ蛋白までの泳動距離を測定すると図2に示す通り、泳動時間を長くすると泳動距離も長くなった。逆に時間が短い20分、25分泳動では、

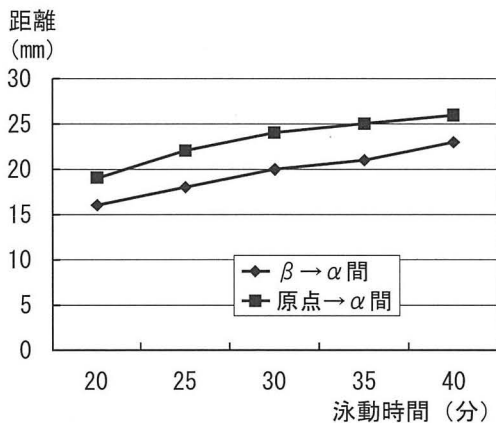


図2 泳動時間の変化

$\beta$ リポ蛋白分画とpre- $\beta$ リポ蛋白分画のバンドの距離がせまく、きれいに分離されていなかった。30分泳動では各バンドがきれいに分離され、最もシャープであり最適であった。

##### (3) 固定時間

まず固定時間を1分、3分、5分と変えて行ったがすべてきれいに染色でき、1分という短い時間でも固定されることがわかった。さらに固定時間を10秒、20秒、30秒と短くして行ったが、10秒でも染色結果に変化はなかった(図3)。このことから、リポ蛋白は瞬時に固定されるのではないかと考えられる。しかしマニュアルで5分と設定されているのは、異常低値や異常高値、一部高値の検体などで染色結果が損なわれるためではないかと思われる。今回は5分を固定時間としてその他の検討を行った。

##### (4) 脱色時間

脱色時間を1分、3分、5分、7分、10分、15分と変えて行った。1分でもゲルのback groundはぬけたが、むらなく脱色されるためには5~7分が適当だと思われる。今回は7分を脱色時間として検討を行った。

##### (5) 染色時間

染色時間を1分、3分、5分、7分、10分、15分と変えて染色した。1分、3分では染色性が弱く、5分ではpre- $\beta$ リポ蛋白分画の染まりがシャープではなかった。7分からそれぞれのバンドの染まりがよい結果となったため、染色液が新しい場合7分が最適であると考えられる。

##### (6) 染色液の保存期間

染色液の保存期間を当日調整、1週間、2週間、3週間、6週間と変えて染色した。当日調整から1週間、2週間までは、染色性が良好であり、3週間目で少し

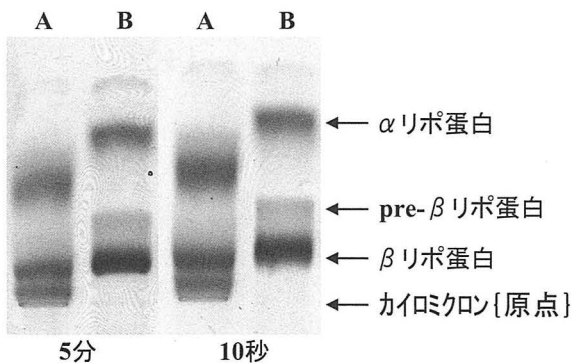


図3 固定時間の検討

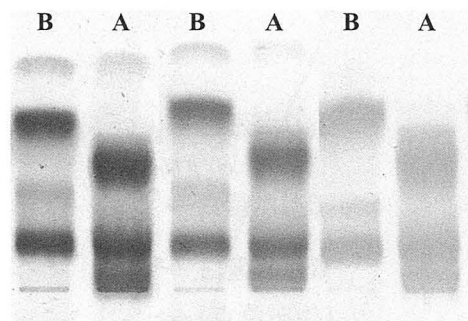


図4 染色液の保存期間の検討

A: 異常検体 B: 健常検体

A: 異常検体 B: 健常検体

染色液の劣化が認められたが測定可能だった。6週間保存では、7分染色で染まりがかなり弱く、染色時間を15分に延ばして染色したが、3週間保存と比べて染色が不鮮明であった(図4)。従って、新しい染色液ほど染色性がよく、多少古くなるにつれ染色時間を延長すれば各分画の染色は可能で、3週間までは使用可能である。しかし、それ以上の保存は染色能劣化のため使用できなかった。古いものは水分などが混入して濁った溶液になりやすいため、新しい染色液を調整する必要があると思われる。

以上の(1)~(6)の泳動条件について検討した結果より、最適の条件を使用して、以下の検討を行った。

2) 同時再現性について

(1) 単一ゲルにおける同時再現性

図5はリポ蛋白分画電気泳動後のデンストメーターパターン図である。健常検体①を単一ゲル上で8回分析した各リポ蛋白分画の分析結果を表1に示した。各リポ蛋白分画割合の変動係数:CVは、 $\alpha$ 分画で5.2%, pre- $\beta$ 分画で9.4%,  $\beta$ 分画で4.6%であり、良好な結果が得られた。

(2) ゲル別同時再現性

健常検体②のリポ蛋白分画について、ゲル10枚で1

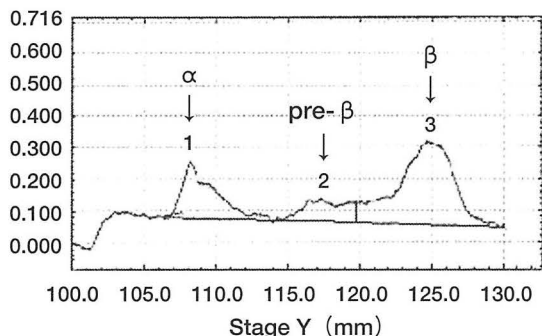


図5 デンストメーターによるリポ蛋白パターン図

ゲル2重測定し、合計n=20の同時再現性を調べた。各リポ蛋白分画は、 $\alpha$ 分画でCV 6.5% (平均±SD: 37.8±2.5), pre- $\beta$ 分画でCV 13.6% (7.8±1.1),  $\beta$ 分画でCV 3.3% (52.8±1.7)となり比較的良好な結果が得られた。

3) 検体保存によるリポ蛋白分画への影響

(1) 室温保存

健常検体および異常検体の室温保存(0日~14日まで)日数の違いにおけるリポ蛋白分画の変化を調べると、易動度に著しい変化が見られた。図6に示すように1日目から分離に変化がみられ、pre- $\beta$ リポ蛋白分画と $\beta$ リポ蛋白分画の分離が可能であるのは2日保存までであった。4日以上保存では分離不能となり、変性が著しいことが判明した。

特に、採血当日の検体では、pre- $\beta$ リポ蛋白分画と $\beta$ リポ蛋白分画の間に比較的シャープなバンドとしてリポ蛋白 Lp(a) (約30mg/dl以上のとき検出可能)を

表1 同時再現性

	$\alpha$ (%)	pre $\beta$ (%)	$\beta$ (%)
1	34.8	19.5	45.653
2	33.5	19.8	46.688
3	38.9	19.3	41.833
4	38.0	15.8	46.160
5	36.5	19.1	44.313
6	37.0	16.0	47.059
7	36.0	16.4	47.559
8	38.9	18.3	42.782
平均	36.71	18.03	45.256
SD	1.925	1.688	2.081
CV%	5.2	9.4	4.6

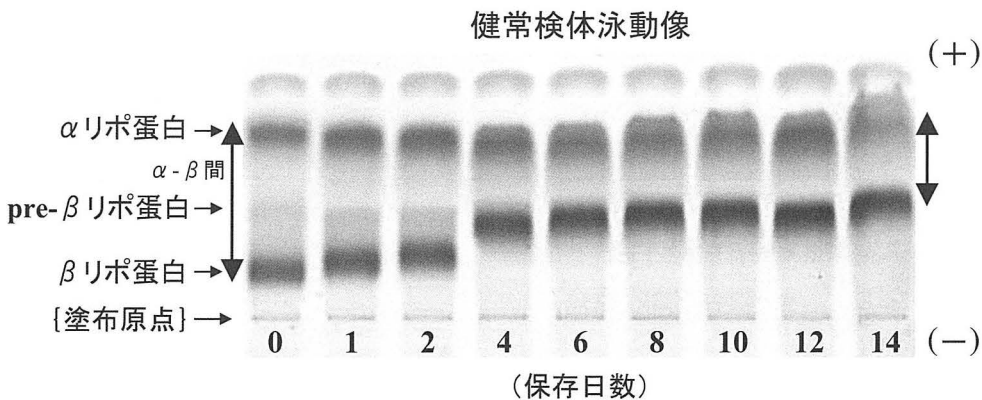


図6 室温保存によるリポ蛋白分画の変化

検出することがあるといわれている<sup>6)</sup>。Lp(a)は1963年にノルウェーの遺伝学者により、 $\beta$  リポ蛋白の遺伝的変異型として報告され、シアル酸を多く含むリポ蛋白である<sup>7,8)</sup>。ただし、Lp(a)は採血した当日でないと検出できないことが多いため、このような遺伝性リポ蛋白検出のためには、なるべく早くリポ蛋白分画測定をすることが必要だと考えられる。

(2) 冷蔵 (3 ~ 5℃) 保存

$\alpha$  リポ蛋白 ~  $\beta$  リポ蛋白分画までのピーク距離は 0 ~ 14日まで変化がなかった。しかし、泳動像の各分画変化を調べると健常検体はきれいに分離されるのは4日目までであった。6日目以降は pre- $\beta$  リポ蛋白の減少が認められ、pre- $\beta$  リポ蛋白分画の易動度が変化しており、保存日数がたつにつれ  $\beta$  リポ蛋白分画と pre- $\beta$  リポ蛋白分画の距離が狭くなり分離不能であった(図7)。

pre- $\beta$  リポ蛋白は、脂質成分として TG を多く含んでいる。数日以上冷蔵保存した場合、pre- $\beta$  リポ蛋白が減少したのは、血清中のわずかなりパーゼの存在により、TG が水解されたためと考えられる。従って、

冷蔵保存の場合、4日以内の測定が重要であると判明した。

今回使用した異常検体では、pre- $\beta$  リポ蛋白分画が認められないため、その変化はわからないが、室温保存と比較すると、 $\alpha$  リポ蛋白分画や  $\beta$  リポ蛋白分画の易動度に大きな変化はなかった。

(3) 冷凍 (-20℃) 保存

健常検体 (図8-1)、異常検体ともに14日保存まで大きな変動はみられなかった。また、電気泳動像をみても pre- $\beta$  分画の易動度の変化は認められず、鮮明で良好な分離が得られた (図8-2)。長時間保存する場合、-20℃以下の冷凍保存が適当であることがわかった。

ただし、血清塗布に時間がかかると初めに塗布した血清が拡散してしまうため、血清塗布はすばやく行う必要がある。

脂質代謝異常の診断や病態把握のためには、TC や TG などの脂質測定だけでなく、リポ蛋白分画測定が重要と考えられ、測定にあたっては、検体保存の方法に十分注意する必要がある。

学生が脂質代謝異常の知識を深めるためには、脂質

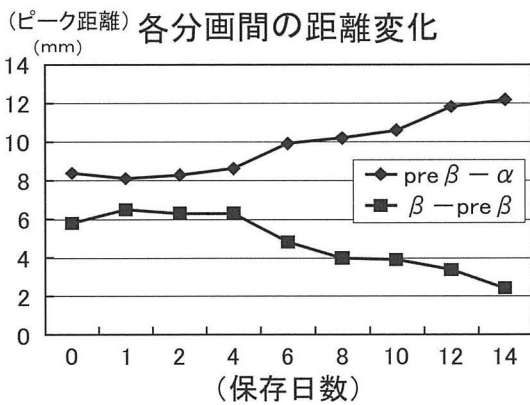


図7 冷蔵保存によるリポ蛋白分画の変化 (健常検体)

リポ蛋白分画の泳動像

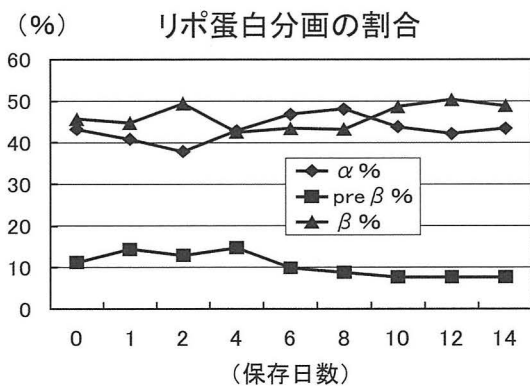
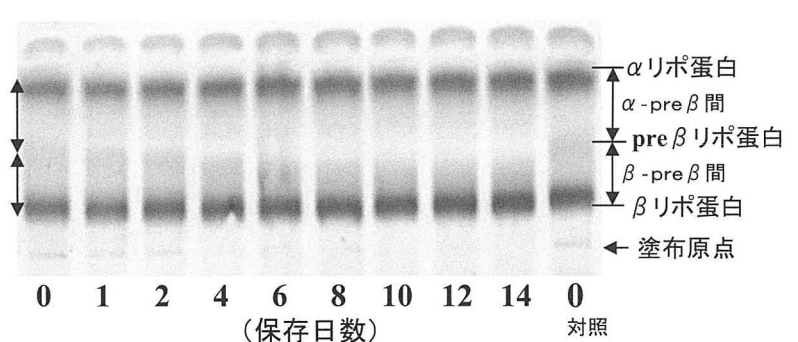


図8-1 冷蔵保存によるリポ蛋白分画の割合 (%)

リポ蛋白泳動像

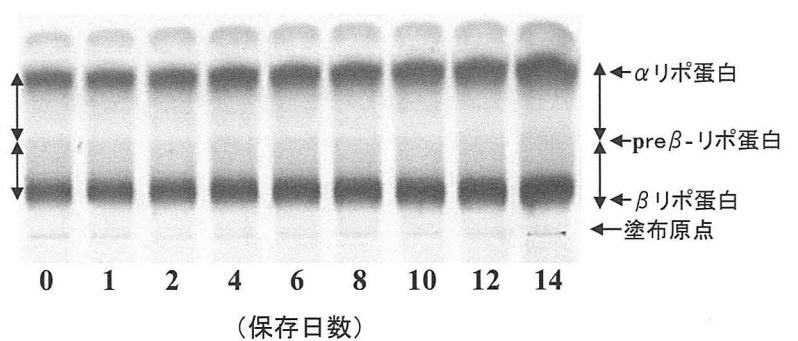


図8-2 冷蔵保存によるリポ蛋白分画泳動像 (健常検体)

検査に加えて、リポ蛋白分画検査の実習が大切になってくる。今回検討したアガロース電気泳動法によるリポ蛋白分画測定法は、比較的簡単に精度よく測定できる方法であり、学生実習導入にあたり十分適した方法であると思われた。

## 文 献

- 1) 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，40(9)：997—1007，1996.
- 2) Fredrickson DS, et al：The apolipoproteins. Adv. Exp. Med. Biol. 26：25—56，1972.
- 3) 杉内博幸：LDL/HDL コレステロール，Medical Technology 27(5)：421—430，1999.
- 4) 櫻林郁之介：日常診療での脂質・リポタンパク検査の役割，Medical Technology，25(10)：968—970，1997.
- 5) 日高宏哉，戸塚 実：リポタンパクとアポリポタンパク，Medical Technology 27(7)：619—625，1999.
- 6) 日高宏哉，戸塚 実：アガロース電気泳動法とディスク電気泳動法，Medical Technology 25(10)：997—1003，1997.
- 7) Berg K：A new serum type system in man：The Lp system, Acta Path. Microbiol. Scand. 59, 369—382, 1963.
- 8) 川出眞坂：遺伝型リポ蛋白 Lp(a)，臨床検査臨時増刊，29(11)：1379—1382，1985.