

リポ蛋白異常症のスクリーニング

武 内 望
(愛媛大学医学部附属病院)
(中央検査部)

緒 言

先天性リポ蛋白異常症のモニタリングにはアポ蛋白の分析が必要であり、そのためにはまずこれらの症例を抽出することと、抽出した症例のアポリポ蛋白の分析を行う二段階が必要である。症例の抽出には精度はさておき、できる限り少量の試料を用い短時間で簡単に行いうる方法が望ましい。このため日常検査でスクリーニングに必要な最小限の項目としては血清総コレステロール (Ch) とトリグリセライド (TG) があげられ、これに HDL Ch の定量を加えることが好ましいが、とくに前二者は必須と考えられる。この方法は全血で試験紙を用い定量しうるようにすべきであるが、数種類の酵素と発色系との固定化、反応の迅速化を計らねばならず、酵素の安定性などの問題もあり、現在検討を行っている。アポ蛋白の分析には血清リポ蛋白の分離、脱脂、アポ蛋白の分画の3段階が必要であり、これには種々の方法があって、それぞれ利点と欠点とを有しているが、これらの方法を組合せて、より簡単に精度を落さず分析を行いうる方法が要求される。今回は病態が複雑な高 TG 血症を対象としてアポ C、E の分析について検討することを目的として実験を行った。

方 法

1. 血清リポ蛋白の分離法

Hatch, Lee¹⁾ の超遠心法、およびヘパリン-MnCl₂、デキストラン硫酸-CaCl₂、隣タングステン酸-MgCl₂ などのポリアニオンによる方法ならびに免疫学的な HDL 分離法を用いた。超遠心法は血清にその1/2量の比重1.006の食塩水を重層し、101,000 G、14時間遠心し、浮上したVLDLを含む上層の1/6量を採取してVLDL画分とした。濃縮が必要な場合にはコロジオン膜に入れて減圧吸引し、必要量にまで濃縮した。ポリアニオンによる分離法は血清に沈澱試薬を加えてVLDL、LDLを沈澱させ、10分間放置後3,000 rpm、10分遠心し、沈澱部分は0.02 M TrisHCl、0.1 M NaCl、0.017 M Na-citrate (pH 7.7) の1 mlに溶解した。この溶液に再び沈澱試薬を加えて遠心分離し、同じ操作を再度繰返した。免疫学的方法ではアポB抗体を加え、生じた沈澱を分離し、これらの沈澱画分は0.01 M Tris HCl (pH 8.6) の0.05 mlに懸濁した。

2. リポ蛋白の脱脂法

アセトン-エタノール、クロロフォルム-メタノールなどの有機溶媒混液による脱脂法およびテトラメチルウレア (TMU) を用いる方法を検討した。前者では-20°Cにおいて10~20倍量

の有機溶媒混液で2回脂質を抽出し（ -20°C で2時間放置），その後さらに冷エチル・エーテルで1時間抽出を行い，アポ蛋白画分を遠心分離した。沈澱画分は乾固後0.05~0.1 ml の TrisHCl (0.01 M, pH8.6) に溶解した後遠心し上清を分離した。TMU 脱脂法はリポ蛋白溶液と等量の TMU を加えて混和し，3,000 rpm 10分遠心し上清部を用いた。TMU 法では脱脂とともに不溶性のアポ B 画分の除去を行いうる。

3. アポ蛋白分画法

Kane²⁾ の方法による PAG デスク電気泳動と平板等電点電気泳動³⁾ を用いた。後者は pH 4.0~6.0 の 2% のアンフォラインを含んだ PAG 平板を用い，LKB 泳動装置 multiphor 2117 により1,400 V, 30 W で1.5時間泳動した。泳動終了後スルフォサリチル酸，三塩化酢酸を含むメタノール水溶液で固定して Coomassie brilliant blue で染色し，バックグラウンドを充分エタノール酢酸混液で脱色した後，デンストメータで濃度を測定し，各分画の比率を求めた。

成 績

超遠心一有機溶媒による脱脂—PAG デスク電気泳動の組合せによる分析法を標準として他の方法を組合せた分析法を比較した。標準法では図1上段に示すように陽極側に VLDL アポ蛋白のアポ C 群が分画され，それより陰極側に アポ E 群を分離しうる。超遠心法に対しポリアニオン法で分けた画分では PAG で泳動すると図1中，下段のようにアポ C 群の分離は可

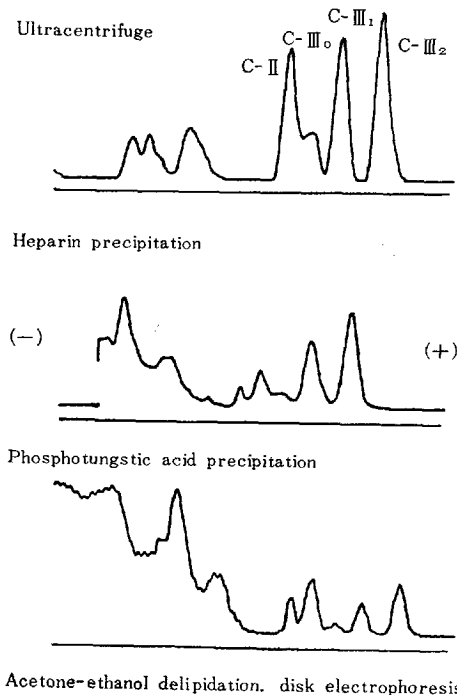


図1 Comparison of Separation Methods of Lipoproteins

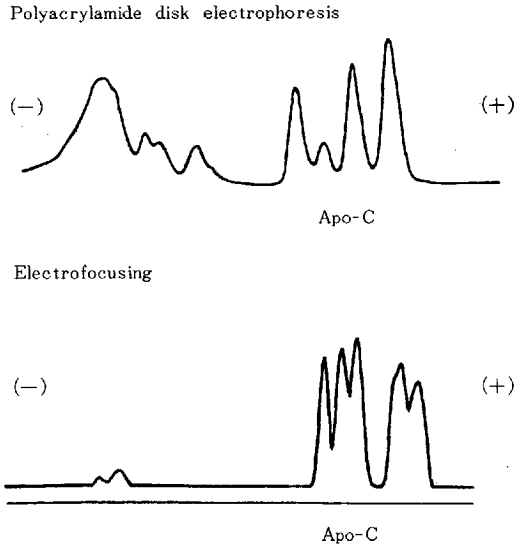


図2 Apolipoprotein Profiles of Disk and Electrofocusing Electrophoresis

Serum 1 ml
 ↓ added 0.1 ml 4g/dl phosphotungstic acid
 0.025 ml 2M $MgCl_2$
 ↓ centrifuged at 3,000 rpm for 10 min.
 Precipitate
 ↓ dissolved in 1ml 0.02M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.017 M
 Na-citrate (PH 7.7)
 added 0.1 ml 4g/dl phosphotungstic acid
 0.025 ml 2M $MgCl_2$
 ↓ centrifuged at 3,000 rpm for 10 min.
 Precipitate
 ↓ repeated same procedure once more
 Precipitate
 ↓ suspended in 0.05 ml 0.01M Tris-HCl, 0.01M
 dithiothreitol (PH 8.6)
 added 0.05 ml tetramethylurea
 ↓ centrifuged at 3,000 rpm for 10 min.
 Supernatant
 ↓
 Isoelectrofocusing Electrophoresis (PH 4.0-6.0)

図3 Procedure for Analysis of Apo C and E Lipoproteins

能であるが、アポE群には混在する他の血清蛋白が重なり、とくに燐タングステン酸法では大量の蛋白が混在し、測定が不可能であった。また免疫法でも混入した血清蛋白のため分析が困難であった。

PAG アスク電気泳動の代りに pH 4.0~6.0 のアンフォライン PAG 平板法で泳動すると、図2のようにアポEに重なった蛋白画分はアポC群より酸性側に移動し、完全に分離した。

ポリアニオン法の比較では燐タングステン酸による方法が沈降し易い沈澱を生じ、沈澱と溶解の操作を繰返すため、アポ蛋白の回収率が優れていると思われる。

脱脂法は TMU による方法が簡便であり、短時間で、しかも低温装置がいらず、有機溶媒による方法との結果を比較しても差は認められなかった。

そのため図3の操作によりアポ蛋白の分画を行うこととし⁴⁾、この方法によれば全行程を5～6時間で行い、同時に24検体を処理しうる。さらに血清量を少なくするためにはアンフォライ

表1 Compositions of Apo-C Lipoprotein in Healthy Subjects

Separation Procedures	Delipidation methods	Apo-C II	Apo-C III-1	Apo-C III-2
Ultracentrifugation-Disk Electrophoresis	Acetone-Ethanol	27.7±0.97*	32.3±0.35	39.9±0.79
Phosphotungstic Acid-Disk Electrophoresis	Acetone-Ethanol	26.8±1.16	33.2±0.20	39.9±1.12
Heparin-Disk Electrophoresis	Acetone-Ethanol	30.1±1.91	29.3±1.19	40.7±0.78
Phosphotungstic Acid-Electrofocusing	Chloroform-Methanol	29.4±1.75	33.8±2.06	36.8±0.49
Phosphotungstic Acid-Electrofocusing	Tetramethyl Urea	28.3±2.79	33.7±1.73	37.9±1.27

* mean±S.E.M. (%)

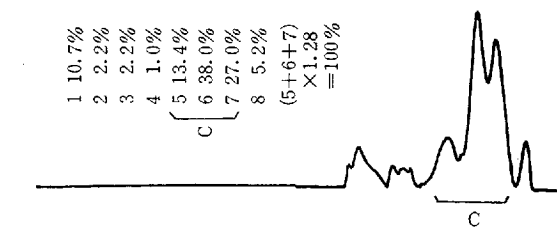
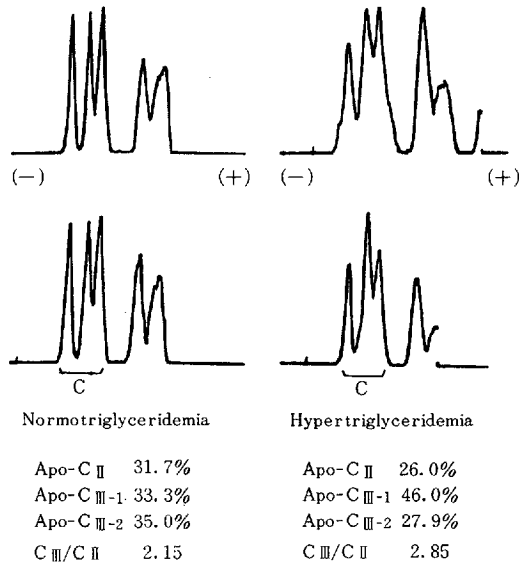


図4 Patterns of Apo-C Lipoproteins from Normo- and Hypertriglyceridemic Patients on Electrofocusing Plate

ンの PAG デスク泳動法を用いなくてはならないと考えられる。

表 1 に異なった組合せによってえられた正常人のアポ C 画分の成績を標準法と比較して示したが、ほぼ等しい結果がえられた。

燐タングステン酸法—TMU による脱脂—等電点電気泳動を組合せた方法により IV 型高リポ蛋白血症患者のアポ C を分画すると Carlson ら⁵⁾ の示唆しているように、LPL の活性化因子とみなされているアポ C II が減少し、その阻害因子であるアポ C III が増加している症例が多く認められた (図 4)。空腹時血清が著しく高く、CM のクリアランスの低下していると考えられる 1 症例 (下段) ではアポ C II 17.1, C III₁ 48.5, C III₂ 34.4% (補正值), C III/C II 比 4.85 であり、アポ C 群のアルカリ側に異常バンドが認められた。

考 察

近年、血清リポ蛋白の基礎的臨床的研究が著しく進み、一部ではその構造や機能も明らかになり、種々の先天的な異常も見出されてきた。アポ蛋白には表 2 のように A より G までの種類があり、これらにはさらに幾つかの亜画分が存在している。したがってそれぞれの画分に過剰症と欠損症が存在する可能性があり、現在までに表 3 のような先天性疾患が知られている。

最もしばしば認められる家族性高 Ch 血症 (IIa 型または高 LDL 血症) は常染色体劣性遺伝であり、ホモ接合子による例はきわめて重症で有効な治療法はなく、早期に虚血性心疾患を発症する。これらの患者では細胞膜の LDL レセプターに異常があり、両親が保因者である場合には羊水細胞を用いたレセプターの測定による生前診断が必要である。同様に虚血性心疾患の危険因子としてあげられている疾患に低 HDL 血症がある。血清総 Ch によりスクリーニングを行う場合にはこれらの疾患では総 Ch の低い症例や正常に近い症例が多いため見逃がすおそれがある。そのため HDL Ch の測定を行わねばならず、この操作がやや煩雑なためスクリーニングとしては用い難く、一つの問題点となるであろう。また高 TG 血症を伴う症例 (I, IV, V 型) には HDL の低い者が多いが、これらは TG の値により症例の抽出は可能

表 2 アポ蛋白の種類と機能

アポ蛋白	分子量 ×10 ⁻³	アミノ酸数	血中濃度 mg/dl	機 能
A-I	28.3	243	80-130	LCAT の活性化
A-II	17.0	154	30- 50	HDL の構築, LCA の活性阻害
A-IV	46		10- 18	
B	10~25		70-100	TG の転送, LDL 受容体結合
C-I	6.3	57	3- 7	LCAT, LPL 活性化
C-II	8.8	78	3- 5	LPL 活性化
C-III	8.8	79	8- 15	LPL 活性抑制
D (A-III)	22		2- 4	EC 転移, LCAT 活性化
E	39		3- 6	LDL 受容体結合, HTGL 活性阻害
F	28			
G				

表 3

Abnormal apolipo-proteins & related enzymes	Hyper		Hypo or deficiencies	
	Genotype	Phenotype	Genotype	Phenotype
Apo A	Hyper alpha Lipoprotein	Hyper HDLC (hypercholesterolemia)	Tangier HDL Milano HDL	Hypo HDLC (hypcholesterolemia)
LCAT			LCAT deficiency	Low ester cholesterol
Apo B	LDL receptor negative or defective	IIa	Beta lipoprotein deficiency Hypo beta lipoprotein	Hypolipidemias
Apo C			Apo C deficiency High C _{III} /C _{II}	I or V IV
LPL			LPL deficiency	I or V
Apo E			Apo E _{III} deficiency Apo E variants	III
HTGL			HTGL deficiency	

である。

アポ A や B の欠損症では血清脂質値が著しく低い場合、スクリーニングに際し、充分注意を払えば見逃がすことは少ないと考えられる。アポ A 欠損症では血中に少量見出される HDL 亜画分に異常があり、代謝が著しく亢進しているものもある。またアポ蛋白のアミノ酸組成の異なった HDL Milano のような異型 HDL の報告もある。HDL が高値の例では虚血性疾患の罹患率が低くて平均寿命も長く、健康保持には好都合の条件であり、実際上問題にはならない。まれな疾患であるが LCAT 欠損症では Ch のエステル比が低下するが、軽度の高脂血症を来すのみで、Ch, TG によるスクリーニングでは検出は不可能と思われる。

次に高 TG 血症を来す CM 血症では CM 中の TG の脂肪組織への取り込みに作用する LPL の欠損と、その活性化因子のアポ C II の欠損が知られている。これらは中鎖脂肪による治療法が可能のため、早期に発見し対策を講ずべきである。TG と Ch が増加し、特異的なアポ蛋白パターンを示すブロードβ病 (Ⅲ型) は HTGL の機能障害あるいはアポ E₃ 欠損や異型 E により VLDL → LDL の代謝過程に障害を来し、中間代謝物である IDL が増加したものと考えられる。高 TG 血症のうち VLDL の増加するⅣ型では VLDL の産生過剰と異化障害によるものがあり、C_{III}/C_{II} 比が増加しているといわれている⁵⁾が、われわれの成績では必ずしも全例に見出されるわけでないため、他の原因によることもあるであろう。今回顕著な高 TG 血症の 1 例で VLDL アポ蛋白に異常な亜画分が見出されたが、これらが何らかの代謝異常を惹起する可能性もある故、検討を加えている。

結 語

血清 VLDL のアポ蛋白画分をより簡便に分析する方法について検討し、これにより高

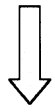
TG 血症のアポC蛋白画分の解析を行った。高TG 血症ではCⅢ/CⅡ比の上昇を来たす症例が多くみられ、1例では異常バンドの出現を認め、これらにつきさらに検討を加えている。

主 要 文 献

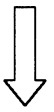
- 1) Hatch, F. and Lee, R.S. : Adv. Lipid Res., **6** : 1, 1968.
- 2) Kane, J.P. : Anal. Biochem., **53** : 350, 1973.
- 3) Albers, J.J. and Scanu, A.M. : Biochim. Biophys. Acta, **236** : 29, 1971.
- 4) 片山善章, 武内 望 : 臨床病理, 投稿中.
- 5) Carlson, L.A. and Ballantyne, D. : Atherosclerosis, **23** : 563, 1976.

略 語

CM : カイロミクロン
VLDL : 超低比重リポ蛋白
IDL : 中間比重リポ蛋白
LDL : 低比重リポ蛋白
HDL : 高比重リポ蛋白
TG : トリグリセライド
Ch : コレステロール
LPL : リポ蛋白リパーゼ
HTGL : 肝性トリグリセライドリパーゼ
LCAT : レシチン : コレステロール・アシル転移酵素
PAG : ポリアクリルアמידジェル
TMU : テトラメチル尿素



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結語

血清 VLDL のアポ蛋白画分をより簡便に分析しうる方法について検討し,これにより高 TG 血症のアポ C 蛋白画分の解析を行った。高 TG 血症では IC /C 比の上昇を来たす症例が多くみられ,1 例では異常バンドの出現を認め,これらにつきさらに検討を加えている。