

血清脂蛋白の研究

第 2 編

血清脂蛋白の電気泳動特に仮面脂質について

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾左知丸教授）

専攻生 戸 倉 又 晴

〔昭和 33 年 10 月 17 日受稿〕

血清脂蛋白は臓器への輸送中の脂肪球とは別にそれ自身重要な生物学的意義をもつものと考えられるが、その機能は未だ具体的に明かにされていない。之を究明する一つの手掛りとして濾紙電気泳動法を利用する事を考えた。

濾紙電気泳動法は微量の材料で然も比較的簡単に測定出来、同一条件で泳動させたものを脂質と蛋白質各別々に染色する事により、脂質がどの蛋白分割に結合しているかを知る事が出来る。一方又種々の溶媒を使用して抽出する事によつて、各蛋白部分に結合している脂質の種類を知る事が出来る。然も濾紙電気泳動法によつて脂質の定量も可能であり、Sudan III¹⁾²⁾ 或は Sudan black B¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾ (以下 S. B. B と記す) 染色法で優秀な結果が得られる事は文献に示された如くである。然し S. B. B によつて染色された物質がすべて脂質であるかどうかは充分吟味を要する点である。

以下脂蛋白測定のための基礎実験として S. B. B による測定法を検討すると共に、S. B. B 染色によつて得られた結果について報告する。

材料及び方法

材料には空腹時の人血清及び家兎血清を使用した。血清は溶血によるヘモグロビンの影響を防ぐために(ヘモグロビンは可成多量の脂質を含む⁷⁾) 遠心沈澱管中に流動パラフィンを塗り、この中に血液を注いで充分注意して遠心分離したものを用いた。溶血を起したものは勿論除外する。蛋白質の泳動には第 1 編⁸⁾ に述べた自作の電気泳動装置(4 枚直列に連結)を使用し、一般に行われる蛋白質の濾紙電気泳動法と同様にペロナール緩衝液 pH 8.6 $\mu=0.1$ を用いた。濾紙は Carl Schleicher の 30×4 cm² のものを使用し、血清は 0.04 cc を展開した。展開条件

は 26°C, 110 V, 0.4 mA/cm にて 6~7 時間泳動した。この際予め Bromphenol blue を血清に溶解し置き、この血清を濾紙の一端につけてアルブミンが 7~8 cm 泳動した所で泳動を中止した。蛋白質の分割の測定には泳動濾紙を 100°C, 20 分加熱乾燥し Bromphenol blue で 30 分間染色し、2% 醋酸溶液で洗滌、水洗後風乾してアンモニアにて充分アルカリ性となしパラフィンで封じた。之をそのままデンストメーターにかけ波長 560 m μ の光源を用いて吸光曲線を描き、プランメーターでその面積を測定した。

次に脂蛋白の測定は S. B. B 染色によつて行つた(S. B. B は National Anilin Division 製品)。染色に先立ち展開後濾紙を次の如く色々な方法で処理した。この目的は脂質と蛋白の結合状態或は固定によるその変化等を知るためである。即ち

- 1) 真空乾燥; 26°C, 2 時間。
- 2) 熱処理; 110°C, 20 分。
- 3) カルシウム中性ホルモン(炭酸カルシウム添加)を噴霧し 5 分間固定。
- 4) カルシウム中性ホルマリン処理 5 分後真空乾燥 26°C, 2 時間。
- 5) カルシウム中性ホルマリン処理 5 分後 0.1% ペプシン, pH 1.8 にて 26°C, 8 分処理。
- 6) 真空乾燥後カルシウム中性ホルマリン処理 5 分, 更に 0.1% ペプシン pH 1.8 にて 26°C, 8 分処理。
- 7) 真空乾燥 26°C, 2 時間後カルボン酸あるいは石炭酸処理(25% 酢酸 pH 1.8, 5% 蔞酸 pH 1.2, 5% 枸橼酸 pH 1.8, 26°C, 10 分, 5% 石炭酸 pH 1.2, 37°C, 10~15 時間)。

以上の通りである。このような処理の後 S. B. B 染色を行つた。S. B. B 染色液は 55% エタノールに

S. B. B を充分飽和量だけ入れて100°C, 5分間加熱溶解したものを2~3日放置後濾過して作った。この染色液中で37°C, 12~15時間染色した。染色容器には二重瓶を使用した。染色後55%エタノールで(15分間に3回同液を交換して)洗滌し余分の S. B. B を取除き、風乾しそのままデンストメーターによつて吸光度を測定した。研究者によつては6,300Å⁹⁾や5,900Å⁴⁾のフィルターを使用しているが、ここでは光源の都合上フィルターを使用せず直

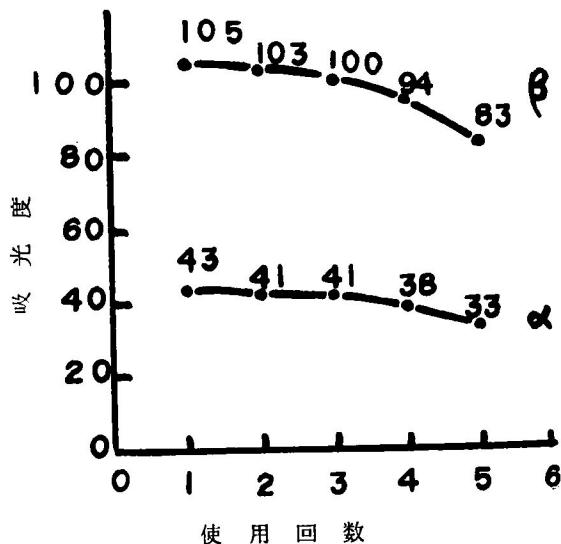
接タングステン光源で測定した。得られた脂蛋白の吸光曲線から蛋白質の場合と同様にして面積を算定した。なおこれ等で得られた結果は少数例の統計処理を施して有意差の検定を行った。

実験結果

正常人の血清蛋白を濾紙電気泳動し、従来一般に行われている如く110°C, 20分乾燥して S. B. B 染色を施すとグロブリンの3つの分割即ち α , β , γ に脂質が証明される(図1)。しかし β と γ との間には屢々明瞭な分離が現われず多くの人がそれと一緒にして β 分割としている。著者も本実験では β と γ を一緒にして之を β 分割として取扱う事にした。

しかし生化学定量法から脂質はアルブミン及び α_1 , α_2 , β , γ の各グロブリン分割の総てに存在する事が明かにされている¹⁰⁾ から、本法で求められるものは血清中の総ての脂蛋白ではなく、その結合形態によつて全く S. B. B に親和性をもたないものは本法では測定出来ない事になる。又本法はあくまで準定量的なもので、例えば S. B. B 液も何回も使用していると後に至るほど染色性が低下する(図2)。この事は絶対量の測定が不可能である事を示

図2 S. B. B 使用回数と家兎血清脂蛋白染色度の変化



す。しかし如何に染色度が低下しても α , β の比に変化はなく、結論的に α , β 分割の比は大した誤差なく求められる。

従つてここに得られた値は同一条件での対照を取り、それに対する増減を示すものである。血清脂蛋白は前述の如く、あるものは蛋白と脂質との結合が

図1 正常人血清(女)の蛋白及び脂蛋白の電気泳動像

図中、上、血清蛋白(B. P. B. 染色)
下、血清脂蛋白(S. B. B. 染色)

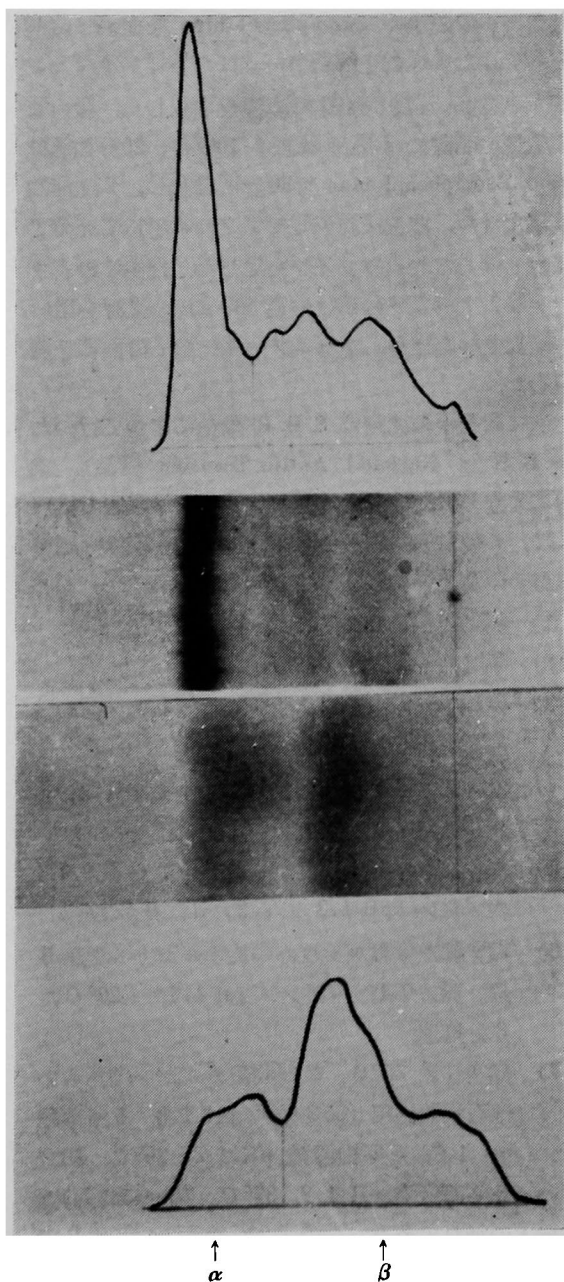
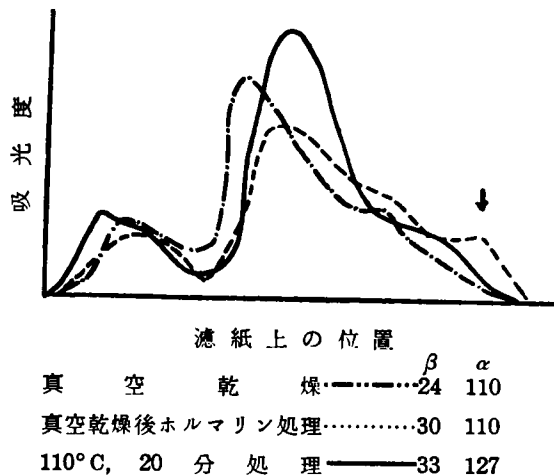


図3 脱仮面処理による家兎血清脂蛋白量の変化



かなり強くそれらはその儘では S. B. B に親和性を示さない。従つてこれらの検出には脱仮面操作を必

要とする。実験方法の部で述べた如く、泳動後種々の処理を施した場合の測定値を示せば図3及び表1の如くである。即ち脱仮面処理により α 、 β 分割の S. B. B 染色性は大きく変化し、特に α 分割の脂質量は著明に変動し α と β との比が変つて来る。 α 分割に於てはホルマリン及び石炭酸処理のものが最低値を示し、110°C、20分熱処理のものが最高値を示した。 β 分割の脂質量は、真空乾燥したもの、ホルマリン処理後真空乾燥したもの、真空乾燥後ホルマリン固定及びペプシン処理したもの等共に低い値を示し、醋酸固定のものが最高値を示した。なお5% 酢酸(pH 1.2)、5% 枸橼酸(pH 1.8)で各々26°C、10分処理したものも酢酸の場合と同様に、何れも α 分割の脂質量は減少し β 分割のそれは増加した。即ちこれらの結果から血清脂蛋白は細胞内脂蛋白と同様、その検出には充分な注意を払わねばならない。

表 1 薬物処理による家兎血清脂蛋白の S. B. B 染色性の変化

分 画	処 理 の 種 類							
	真空乾燥	110°C 20分	ホルマリン	ホルマリン 真空乾燥	ホルマリン ペプシン	真空乾燥 ホルマリン ペプシン	ホルマリン 石炭酸	醋酸
α	43.0	57.2 (+33.0)	45.1 (+4.8)	46.0 (+7)	30.7 (-28.6)	30.4 (-29.2)	28.4 (-33.9)	37.7 (-12.3)
β	105.0	122.5 (+16.7)	120.2 (+14.5)	105.0 0	118.5 (+12.9)	105.0 0	121.6 (+15.8)	130.6 (+24.4)

注. ホルマリン……カルシウム中性ホルマリン 5分処理
 真空乾燥……26°C, 2時間真空乾燥
 ペプシン……ペプシン (pH=1.8) 26°C, 8分処理
 石炭酸……5%石炭酸 37°C, 10~15時間処理
 醋酸……25%醋酸 26°C, 10分処理
 (括弧内は真空乾燥のものに対する増減の百分率)

考 案

ここに用いた S. B. B 染色液は之までの文献に見られるように、脂質の種類により若干色調を異にするとは云え殆んど総ての脂質を染色する¹¹⁾。なお脂質以外の物質も染色される可能性が考えられる(次編¹²⁾に述べる如くこのような物質はかなり存在する)。然し S. B. B 液で染色されたものでアセトン、アルコール、エーテル等の如何なるものにも脱色されないものは、S. B. B とある物質との有極性結合を意味し、これらを脂質の染色から除外する事が出来る。著者が血清を濾紙電気泳動法で展開し、之に S. B. B 染色を施して得られた分割の定量的結果

は、Ackerman¹³⁾が Zone Electrophoresis によつて示した化学的抽出実験の結果とよく一致し、濾紙による場合の方が β 分割がやや大きい値を示す程度である²⁾。濾紙電気泳動法による測定結果が Ackerman の実験結果に比して β 分割が高い値を示すのは、濾紙の荷電による吸着のために α 分割のものが retard されて β 分割に多少 Superpose される結果と思われる。

又 Swahn¹⁴⁾によれば彼は10枚の濾紙を硝子板の間に挟み、それに2~3ccの血清を展開しその1枚で蛋白の染色をなし、残る9枚を各分割毎に切断し抽出して脂質の定量を行い、超遠沈法やアルコール沈澱法で得た脂蛋白の化学的分析結果とほぼ等し

い値を得ている。この事から本実験の展開資料の示す値は、只試料の少いために生ずる誤差が大きい事を意味するもののようである。ともあれ非常に微量の材料を用いて化学的な分析結果とほぼ同一結果をうる事が出来る事は本法が脂質の比較定量法として優れた方法であると云わねばならない。

扱て本実験で示した如く、S. B. B の染色度は S. B. B 液の新旧により非常に変化し易い。この欠点は McDonald⁵⁾ 等が行つたアセチル化した S. B. B を使用する事により除きうと思われる。しかし染色能は低下しても α 、 β 分割の比に変化が認められない事から、本実験の目的のためにはそのまま S. B. B を使用して十分な結果が得られる。かくして Evelyn¹⁵⁾ により示された如く年令と共に脂蛋白の増加して行く状態（男性は女性に比して β 分割が高い値を示す）或は著者の第 4 編の目的である正常人と患者との相違の比較等は可能である。

扱て脂蛋白の性状を見るに、天然に存する脂質特に血清中に見られる脂質は Blix¹⁰⁾¹⁶⁾ によれば、その殆んど総てが蛋白と結合し、グロブリンと結合する脂質は磷脂質 8.5%，コレステロール 11.5%，脂肪酸 20.4% であり、分子量は 330,000 と云う。しかも α 脂蛋白分子は楕円形 (300 Å, 50 Å) をなし、 β 脂蛋白分子は球形 (185 Å) でそれらは脂質と蛋白がモザイク状になつて結合配列すると云われる。しかし α 脂蛋白と β 脂蛋白とはその物理化学的性状を異にし、 α 脂蛋白は単純蛋白同様水溶性であるが、 β 脂蛋白はグロブリンと同様に少量の塩の存在に於てのみ可溶である。しかも pH 5.4 で最少溶解度を示す点もグロブリンと全く同一の性格である。

これら脂質と蛋白質との結合は共有結合、静電結合、副原子価結合等が考えられ、多くの研究者の意見は後二者の何れかに傾いているようである¹⁰⁾¹⁶⁾ が、多分両者の混在した結合様式を取っているものと思われる。何れにしても蛋白は脂質の結合によつてその物理化学的性質を殆んど変化しないのであるから、表在性の原子団との間に結合が起つていようには思えない。

これ等の事実を考慮して脱仮面の機構を考えると、脂蛋白の脂質はその儘ではエーテルによつて抽出されず、蛋白の変性を何等かの方法で起す場合に S. B. B と反応するようになり、又その一部が抽出可能になる事がよく理解される。即ち熱処理による脂質量の増加は蛋白の変性により脂質との結合が弱

まるか、又は蛋白中に包絡されていた脂質の無極性原子団が外部に露われて来た結果と思われる。ペプシン処理による脱仮面も全く同様の機構によるものと考えられるが、この場合 α 分割はむしろ減少し β 分割が増加する。この事はペプシンにより蛋白質が取除かれ、脂質が S. B. B 染色中に溶媒のアルコール中に溶出する事が考えられ、その程度が α 分割の脂質が β 分割の脂質より溶出度が大きいためと思われる。この事は次編に於て述べる結果によつても支持される。カルボン酸の影響は蛋白質の変性や分解を起し、特に核脂蛋白に対する作用が強く¹⁷⁾¹⁸⁾、そのために脱仮面作用を起すものと思われ、又 α 、 β 分割における減少乃至増加はペプシン処理の場合と同様に考えられる。石炭酸の作用については明かでないが、細胞化学的に観察される如くこれは細胞構成要素としての脂質の脱仮面作用が強い¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾ のと類似している。又ホルマリン固定のものが真空乾燥したものより高い値を示すのは、真空乾燥操作によつて仮面作用を受けたためと思われ細胞化学的にも同様な現象を見ている²⁰⁾²¹⁾。濾紙上で脂蛋白が仮面される現象は沖中²²⁾ 等によつても報告されている。更に石鹼液によつても脂蛋白はエーテル可溶性になるので、オレイン酸、パルミチン酸等のナトリウム塩の石鹼を使用し Sudan 色素の染色性を試験して見る事も興味ある問題であろう。

以上のような脱仮面作用は血清におけるものと全く同様に細胞の塗沫乾燥標本に於ても見られる現象であるが、細胞の場合特に乾燥による仮面作用が濾紙上での血清脂蛋白に見られるものより非常に強いのは、血清脂蛋白では脂質と結合する蛋白部分に核酸や磷が存在しないが¹⁶⁾、細胞質の脂質の周辺には極性の高いある種の物質、例えば核酸・核蛋白質の如きものが多量にある事によるのかも知れない。

結 論

血清脂蛋白の研究に当り、濾紙電気泳動法により人血清及び家兎血清を使用し、脂蛋白の仮面作用や脱仮面について究明し、濾紙電気泳動的に脂質測定の限界と方法を検討した。

1) S. B. B により濾紙上の脂蛋白を染色しその染色度により脂質の絶対量を求める事は出来ないがその近似値と、 α 脂蛋白、 β 脂蛋白の量比の測定は可能である。

2) 展開濾紙上の脂蛋白は真空乾燥により仮面作用が起り、110°C の熱処理により脱仮面される。

3) ペプシン, カルボン酸, 石炭酸等は脂蛋白に対し脱仮面作用を呈し S. B. B 染色性を高める. α 脂蛋白は脱仮面により溶媒に溶出し測定値を減ずるも, β 脂蛋白は脱仮面後も溶媒への溶出が少なく脱仮面操作により測定値を増加する.

4) 最後にこれら種々の処理による脂蛋白の S. B. B 染色性への影響から, 仮面, 脱仮面の機構

並に脂質と蛋白質との結合に関して若干の考察を加えた.

稿を終るに臨み本研究に当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りたる妹尾教授に深甚なる謝意を表します.

文 献

- 1) 小林茂三郎, 森五彦: 濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, 東京, 1955.
- 2) Gottfried, S. P. et al.: J. Lab. Clin. Med. 44, 651, 1954.
- 3) Ott H. and Poth. E.: Klin. Wschr. 32, 1099, 1954.
- 4) Wunderly, C. H. and S. Piller: Klin. Wschr. 32, 425, 1954.
- 5) Mc Donald, H. J. and E. W. Bermes: Biochim. Biophys. Acta 17, 290, 1955.
- 6) Alfred, H. and Cattaneo, C.: Klin. Wschr. 34, 581, 1956.
- 7) Seno, S. et al.: Acta Med. Okayama 11, 300, 1957.
- 8) 戸倉又晴: 岡山医学会雑誌 本巻, 本号. 第一編.
- 9) Chapin, M. A.: J. Lab. Clin. Med. 47, 386, 1956.
- 10) James, L.: Blood cells and plasma proteins, P. 337, Acad. Press. N. Y. 1953.
- 11) リゾン著 (今泉訳) 組織化学及び細胞化学, 白水社, 東京, 1954.
- 12) 戸倉又晴: 岡山医学会雑誌 本巻, 本号. 第二編.
- 13) Ackerman, P. G. and Kountz, W. B.: J. Lab. Clin. Med. 44, 517, 1954.
- 14) Swahn, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5-suppl. 9, 1953.
- 15) Evelyn, B. M. and Peters, J. P.: J. Lab. clin. Med. 42, 738, 1953.
- 16) 赤堀四郎, 水島三一郎: 蛋白質化学 3, P. 154, 共立出版, 1955.
- 17) 村上哲英: 日本血液学雑誌 19, 465, 1954.
- 18) 村上哲英: 細胞化シンポジウム 5, 185, 1957.
- 19) Ackerman, G. A.: Science 115, 629, 1952.
- 20) 内海耕健: 医学と生物学 41, 226, 1956.
- 21) 神田三郎: 岡山医学会雑誌 68, 2019, 1956.
- 22) 沖中重雄他: 生化学 28, Suppl. 102, 1956.

Studies on Serum Lipoprotein

2. Electropaperchromatography of lipoprotein especially the masked lipid

By

Mataharu TOKURA

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Seno)

By using the apparatus demonstrated in the first report, the author has studied the lipoprotein of serum, extending at 110 v. for 7 hours filling the space with air and staining with Sudan black B (S. B. B). The following results have been obtained.

1. From the integrated values of the area obtained by densitometry on the papers

stained with S. B. B it is possible to know roughly the amount of lipoprotein of serum and exact quantitative relation between α and β lipoproteins.

2. The drying of paper causes the masking of the lipids of lipoprotein which can be unmasked again by heating at 110°C. for 20 minutes.

3. Pepsin, phenol and some carboxylic acids act as to unmask the masked lipoprotein. After unmasking some lipids escape into the solvent during the S. B. B staining in α -lipoprotein, but not in β -lipoprotein.

4. From the observations on the masking and unmasking of serum lipoproteins the binding modus between lipid and protein and the masking-unmasking mechanisms have been discussed.
