

＜特集＞ リポタンパクの分析(Ⅱ)

血漿リポ蛋白の細分画とその臨床的意義

金沢大学医学部第二内科

中 井 継 彦, 笈 田 耕 治

I. は じ め に

リポ蛋白分画はその物理化学的性状の把握の仕方, 即ち

- ①密度
 - ②分析用超遠心法による浮上性状
 - ③電気泳動法による移動度
 - ④アポ蛋白組成
 - ⑤硫酸多糖体 + 2価陽イオンによる沈澱に対する反応(例えば, ヘパリン・ Mn^{2+} 法)。
 - ⑥粒子サイズ
 - ⑦ヘパリンやコンカナバリン(Con) A に対するアフィニティー
- 等によりそれぞれ名称が異なる。

リポ蛋白はどのような方法で分画されても決して均一な粒子の集団ではなく, 脂質, 蛋白組成, 粒子サイズ等からみて polydisperse, heterogeneous なリポ蛋白の分画であるので, さらに細分画してより均一として, また機能と結びつけて意義づけようとする試みがなされている。HDL の HDL₂ と HDL₃ 亜分画については他の

リポ蛋白との代謝相関, 各々の濃度の性差, 冠動脈疾患との関連において両分画は異なった意義を有することが示唆されている。さらに, Mahley一派の研究¹⁾により, HDL with Apo E が細胞との相関や, 細胞内コレステロール代謝に重要な役割を有していることが報告されている。

本稿では, この様に近年動脈硬化症との関連において, その意義が最も注目されている HDL 分画を中心にリポ蛋白の細分画法および各分画の臨床的意義について方法別に概説する。

II. リポ蛋白の分画法および各分画の意義 —特に HDL 分画について—

1. 超遠心法

a) 分離用超遠心法

分離用超遠心法による HDL₂ (1.063—1.125 g/ml) と HDL₃ (1.125—1.210 g/ml) の細分画には固定角ローターを用いて段階的に密度をあげて分画する方法が用いられている。この方法は通常の超遠心機以外特殊な機器を必要としない点からも, 最も良く用いられている方法である。この方法にて分画した健康成人の HDL₂, HDL₃ 分画の脂質濃度は, Table I のごとくである。

Fractionation and Clinical Significance of Plasma Lipoprotein Subfractions

TSUGUHIKO NAKAI and KOJI OIDA

The Second Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Kanazawa University

金沢大学医学部第二内科
(〒920 金沢市宝町13-1)

Table I Cholesterol (Ch), triglyceride (TG) and phospholipid (PL) concentrations in plasma (P), VLDL+LDL (V+L), HDL₂ (H₂) and HDL₃ (H₃) and HDL₂-lipids/HDL₃-lipids ratios in controls³⁹

		Control
n		9
Ch	P	191 ± 26
	V+L	145 ± 25
	H ₂	20 ± 5
	H ₃	25 ± 4
	H ₂ +H ₃	46 ± 7
	H ₂ /H ₃	0.81 ± 0.23
TG	P	128 ± 37
	V+L	77 ± 32
	H ₂	23 ± 7
	H ₃	28 ± 7
	H ₂ +H ₃	51 ± 13
	H ₂ /H ₃	0.81 ± 0.22
PL	P	212 ± 20
	V+L	97 ± 31
	H ₂	50 ± 19
	H ₃	64 ± 17
	H ₂ +H ₃	115 ± 26
	H ₂ /H ₃	0.86 ± 0.45

b) 分析用超遠心法

リポ蛋白の浮上または沈降には、リポ蛋白粒子と溶媒との間の摩擦、即ち、リポ蛋白粒子と溶媒の理化学的性状、および遠心力が関与している。リポ蛋白の分析用超遠心法による分析方法の詳細は、Lindgren ら²⁾や八杉ら³⁾の論文を参照されたい。

従来、カルフォルニアの Donner Laboratory の Gofman らの一派の分析用超遠心法によるシュリーレン像からの分析より、HDL (1.063—1.200 g/ml) はさらに2つの亜分画、即ち HDL₂ (1.063—1.125 g/ml) と HDL₃ (1.125—1.200 g/ml) の分画に分けられることが報告されている。Lindgren らは、このシュリーレン像をコンピュータ解析することにより、さらに

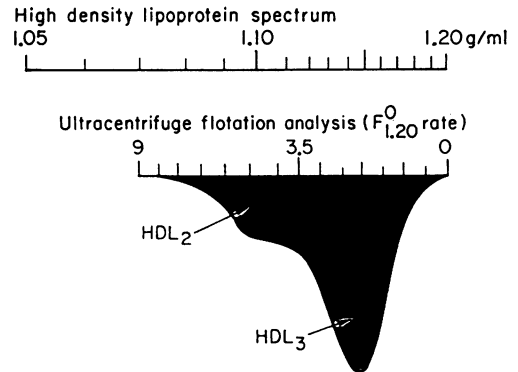


Fig. 1 Schematic HDL spectrum by analytical ultracentrifugation⁴⁾.

細分画するとともに定量化している。

Anderson らは、HDL₂ 分画がさらに HDL₂b (1.063—1.100 g/ml) と HDL₂a (1.100—1.125 g/ml) に分けられ、正常人の schlieren 像は、Fig. 1 のごとくであることを示した⁴⁾。正常人の検索にて、男性、女性ともに血漿 HDL₂b、HDL₂a の濃度はともに HDL コレステロールと強い正の相関が認められた。HDL₃は HDL₂b と負の相関 ($r = -0.315$) を示したが、HDL₂a および HDL-コレステロールとは相関を示さなかった。従って、HDL₂b と HDL₂a が主として HDL-コレステロールを反映していると報告した。

最近、Anderson らにより、density gradient ultracentrifugation により分画する方法が報告されるとともに、後で述べる様に analytical ultracentrifugation により見出された。HDL₂b 分画もこの方法にてとらえられている⁴⁾。

c) ゴーナル超遠心法

ゴーナル超遠心法は一種の密度勾配による超遠心法である。この方法によるリポ蛋白の分析は、Wilcox らにより報告された⁵⁾。さらに、Patsch ら⁶⁾、Kostner⁷⁾ら、Laggner⁸⁾ら、Patsch⁹⁾らにより、応用発展させられた。Patsch らは、HDL₂ と HDL₃ の良い分離を得るために、直線的密度勾配よりも Fig. 2 の様な3段階の

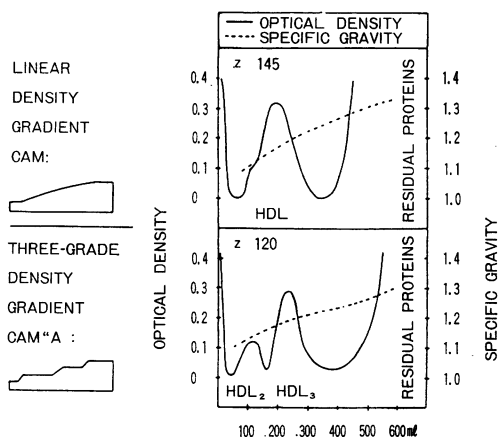


Fig. 2 Elution patterns of HDL of zonal ultracentrifugation⁶.

密度勾配を用いて行なっている。Patsch らの成績⁹⁾では、この方法では Fig. 2 のごとく、HDL は HDL₂ と HDL₃ に相当する 2 つの分画に分画された。この両分画の脂質組成、浮上係数、粒子サイズは分析用超遠心法による成績と一致した。また、アポ蛋白組成では HDL₂ において Apo A-I / Apo A-II 比が HDL₃ に比し大であった。この方法により HDL₂、HDL₃ 分画を分取し、脂質、蛋白を測定することにより、各分画を定量することができる。Shepherd¹⁰⁾ らによれば、HDL-コレステロール、Apo A-I は HDL₂ と相関したが、HDL₃ との相関を認めなかった。女性における HDL-コレステロール、Apo A-I の高値は HDL₂ の増加によるものとの成績が得られた。この方法の利点の一つは、1 回の超遠心にて HDL 分画の profile を知ることができることである。また、この条件下では、リポ蛋白の変性も少ないと報告されている。しかし、15~20 ml の血清を必要とする難点がある。Patsch⁹⁾ らは、HDL₂、HDL₃ 分画をさらに 2 および 5 つの亜分画に分け性状を検討し、平均密度 1.096g/ml のかなり均一な HDL₂ 分画、1.140g/ml の組成のかなり不均一な HDL₃、さらに量的には少ないが、1.160g/ml の HDL₃ 亜分画に分画さ

れることを報告している。ゾーナルローターにて分画された HDL₂、HDL₃ の意義について、Patsch らは、Ⅲ型高リポ蛋白血症における HDL 亜分画に対する clofibrate の効果、正常人に対するニコチン酸の影響を観察し、HDL-コレステロールの上昇とともに HDL₂/HDL₃ 比の増加をみた¹¹⁾¹²⁾。これは、Blum ら¹³⁾が従来の分離用超遠心法を用いてニコチン酸の効果を検討し、HDL₂/HDL₃ 比の増加を報告した成績と呼応するものである。

d) 不連続密度勾配超遠心法

スウィングローターを用いて、密度勾配液中にてリポ蛋白を分画する方法である。

Redgrave ら¹⁴⁾や、Foreman ら¹⁵⁾により、VLDL, LDL, HDL の分画法が報告され、次いで最近、Chapman ら¹⁶⁾により HDL 亜分画 HDL₂, HDL₃ の分画法が報告された。Chung らは、垂直(vertical)ローターによっても上記の様な分画が可能なることを示した¹⁷⁾。

2. 電気泳動法

電気泳動法は機器の面からも最も親しみやすい方法であるので、HDL の細分画について、電気泳動法による種々の試みがなされてきたが、ここでは主として gradient gel electrophoresis による HDL 細分画法について述べる。

a) Gradient gel electrophoresis(GGE)

gradient gel electrophoresis (GGE) は使用するポリアクリルアミドゲルの濃度をある一定の濃度範囲で連続的に増加させ、その pore size を次第に小さくすることで分析する蛋白粒子の大きさ、即ち分子量に応じてその移動度が決定される電気泳動法である。本法は一般に各種蛋白、とくに高分子量の蛋白の分子量推定に広く用いられている。本法をリポ蛋白粒子の性状把握に応用した報告はすでに1969年にみられるが、HDL について分析した報告としては、Anderson ら⁴⁾が密度勾配超遠心法にて得られた HDL の各分画を分析したものが、また、

Weisgraber¹⁸⁾が heparin Sepharose affinity chromatography により分離した HDL₂ with Apo E, HDL₂ without Apo E を分析した報告などがある。この様に種々の方法によって得られた HDL 亜分画を GGE により、分子量の大小の面からその特徴をとらえることができる可能性がある。そこで著者は、分離用超遠心法により得られた HDL₂, HDL₃ 分画を GGE により分析、検討した¹⁹⁾。

健康人より早期空腹時に得られた血漿を Havel らの方法に準じた超遠心法にて、HDL₂ ($1.063 < d < 1.125 \text{ g/ml}$) と HDL₃ ($1.125 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) に分画し、0.15 M NaCl, 3mM EDTA pH 7.4 に対して十分透析した。GGE は Anderson, らの方法⁴⁾に準じて gel として gradient gel PAA 4/30 (Pharmacia Fine Chemicals) (gel 濃度が 4%~30%と連続的に増加しているポリアクリルアミドよりなるスラブゲル)を使用し、Tris borate バッファー, pH 8.35 下にて、試料無添加の状態で70ボルト, 30分予備泳動したのち、試料を添加し、120ボルト, 4℃にて15時間泳動した。固定、染色は10%TCA 下 0.01% Coomassie brilliant blue R にて、脱色は蒸留水により拡散させて行った。その他の染色法として10% amido black による蛋白染色, Sudan black Bを用いた prestaining 法による脂質染色もあわせて検討した。

分析に用いた試料は蛋白量にして10~20 μg で、分析前に Tris borate バッファーにて充分透析した。またカリブレーション蛋白として Electrophoresis calibration kit for molecular weight determination of high molecular weight proteins (Pharmacia Fine Chemicals) を使用した。泳動像のデンストスキャンニングは島津2波長クロマトスキャナー CS-900 を用いた。heparin-Sepharose affinity chromatography は Weisgraber らの方法¹⁸⁾に準じ、溶出塩濃度を 0.05M, 0.095M, 0.29M, 0.6M と段階的に増加させ、溶出させた。溶出された各分画の蛋白濃度は波長 280nm における吸光

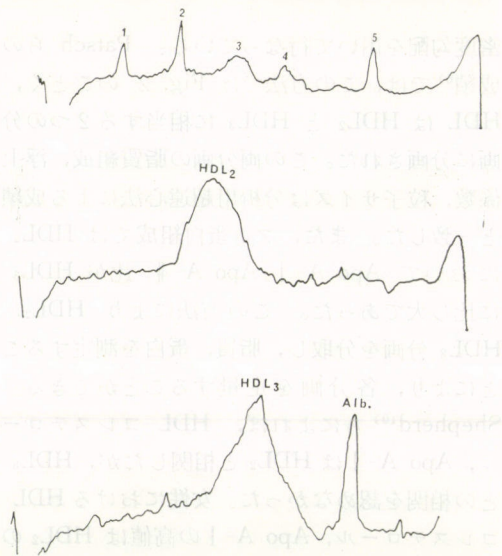
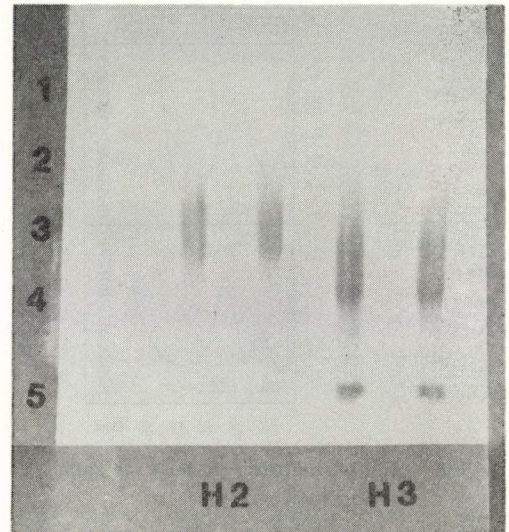


Fig. 3 Gradient gel electrophoresis of HDL₂ (H₂) and HDL₃ (H₃). Densitometry of patterns is shown¹⁹⁾.

度より求めた。

HDL₂, HDL₃ の泳動像 (Coomassie brilliant blue R 染色) およびそのデンストスキャン像が Fig. 3 である。gel 濃度は上方から下方へ連続的に増加しており、したがってその pore size は下方に向って次第に小さくなっている。上端が陰極、下端が陽極にセットされており上

端に添加された試料は陽極側に移動するが、終局的にはもはや通過できなくなった pore size のところで停止する。したがって本法では添加された試料の電氣的荷電状態ではなく、その粒子の大きさ（分子量）に応じて移動度が決定される。泳動像は1つのはっきりしたバンドとしではなく幅をもった像として現われており、HDL の heterogeneity を裏づけている。HDL₃ は HDL₂ に比し明らかに泳動距離が大きく、したがって HDL₃ がより分子量が小さいことが確認できる) $d < 1.063 \text{ g/ml}$ のリポ蛋白 (VLDL, LDL) も分析したが gel 上方にとどまったままであった。分子量の対数と相対的移動度 (Rf) の座標にカリブレーション蛋白の結果をプロットするとききれいな直線関係が得られ、この直線より HDL 分画のみかけ上の分子量を算出した。その結果 HDL₂ は $(1.9 \sim 3.3) \times 10^5$, HDL₃ は $(1.2 \sim 2.9) \times 10^5$ であった。こうして計算された値は試料として用いた HDL がリポ蛋白粒子であるので、その正確な分子量とはいえないが、従来 sedimentation equilibrium analysis などにより測定し報告されている HDL₂, HDL₃ の分子量の値と大きな隔たりはなく、GGE の結果を評価するパラメーターとなりうると思われる。このように GGE が HDL 分画をその分子量の面から特徴づけるのに有用性が高いと考えられた。本法をリポ蛋白に応用したものとして、Pratt ら²⁰⁾, John ら²¹⁾, Bauto-rich ら²²⁾ などの成績がある。Pratt, ら²⁰⁾ は 2%~6.5% の濃度勾配をもった gradient rod gel を作成し、ヒト血漿を泳動した結果、リポ蛋白は VLDL, LMDL (large molecular diameter lipoproteins: ほぼ LDL に相当), SMDL (small molecular diameter lipoproteins: ほぼ HDL に相当) の 3 分画に分かれ、かつ各々の 3 分画は 2~3 の細かいバンドより成っていた。John ら²¹⁾ は Pratt らの方法に準じ 3.5%~8% の gradient rod gel を用いて健康人および Fredrickson II 型高リポ蛋白血症患者の血漿を泳動し、数本みられる LDL バン

ドのパターンが両者で異なり、かつ HDL バンドは II 型高リポ蛋白血症患者では減少していたと報告している。しかし上記の報告での gradient gel の濃度範囲は報告者によりまちまちでそれぞれの成績を比較することが困難である。また分析した試料は血漿で、リポ蛋白全体のプロフィールをとらえるためのものであった。これらとは別に Anderson ら⁴⁾ は 4~30% と比較的高濃度の範囲で濃度勾配をもつ市販の slab gel (gradient gel PAA 4/30, Pharmacia) を用いて HDL を泳動、分析した。彼らは密度勾配超遠心法により HDL ($1.063 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) を比重毎に 12 分画に分け、各分画を GGE により泳動した結果、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おり、各分画の泳動像のデンストスキャン像を総合すると HDL は大きく 3 つの分画に分かれた (I: $d = 1.090 - 1.098 \text{ g/ml}$, II: $d = 1.108 - 1.112 \text{ g/ml}$, III: $d = 1.130 - 1.450 \text{ g/ml}$)。のちに彼らはこれらの分画を HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL₃ としている²³⁾。また、この 3 つの分画の Stokes 径を分析用超遠心法、電子顕微鏡および GGE の結果よりそれぞれ算出すると、3 者間での値は極めて類似していたと報告している。さらにその後、Nichols ら²⁴⁾ は泳動時間を延長することにより、HDL には HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL₃ に加え、HDL₄, HDL₅ と呼ぶべき分画が存在すると報告した²⁵⁾。著者は Anderson らの方法に準じ、HDL を GGE にて分析したが、HDL を上記のごとく明らかな分画に分けることはできなかった。しかし、あらかじめ分離用超遠心法にて HDL₂ ($1.063 < d < 1.125 \text{ g/ml}$), HDL₃ ($1.125 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) に分離しておき、それぞれを泳動すると両者は異なった移動度を呈し、HDL₃ がより小さいリポ蛋白粒子であることが確認された。著者の結果では上下へ延びる淡い染色帯が観察され、その泳動像より HDL を多数の分画に細分画化することは困難と考えられた。しかし、各種実験下において得られる HDL と思われるリ

ポ蛋白や HDL 亜分画をその粒子の大きさから特徴づけることに対して GGE は有用と考えられた。

b) その他の方法

Bon らは, HDL₂, HDL₃ の isotachopheresis により HDL₂ はさらに 6 分画, HDL₃ は 10 分画に分けられることを報告した²⁶⁾。アポ蛋白の分布はこれらの分画ごとに非常に異なっていた。また, HDL の等電点電気泳動も試みられ HDL₂, HDL₃ とともに 5~10 個の亜分画に分けられている²⁷⁾。

3. カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーによる HDL の細分画法には, 高速液体クロマトグラフィー, DEAE アガロースカラムクロマトグラフィー, 等が報告されている。

a) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC にても HDL₂, HDL₃ の分画が可能なことが原らにより報告されている。この詳細については, 前号にて原らにより報告されているのでここでは省略する。

b) Hydroxyapatite column chromatography

Hydroxyapatite (HA) による HDL の細分画の可能性は, 1972 年に報告されているが, その詳細については, 1977 年に Kostner らにより報告された²⁸⁾。HA は Ca⁺⁺ 依存性およびリン依存性の 2 つの結合部位を持つと考えられており, 塩基性ならびに酸性の両蛋白が HA と反応する。しかし, HA による HDL の分画機序の詳細は不明である。分画には HA を CaCl₂ とリン酸ナトリウムにて処理して用いる必要がある。2.5×30cm のカラムにて potassium phosphate buffer, pH 6.8 により段階的に流出し, 8 分画に分画した。主なピークである Peak II は, Apo A-I と A-II のみからなり他のアポ蛋白は認められなかった。Peak III は

Apo A-I, Apo A-II の他に C peptide のうち C-II のみを含有していた。Peak-VII は C-II, C-III のみを含み, Apo A-I, A-II は欠除していた。最後のピークは Apo B 含有リポ蛋白 Lp(a) と LpB HDL と考えられた。脂質/蛋白比は, ピーク I から VII にかけて増加し, TG 含量も順次増加した。

c) Ion exchange column chromatography

従来, アポ蛋白の分離には DEAE cellulose が最も使用されてきた。Rubenstein は DEAE cellulose DE 52 と DEAE Biogel A agarose を用いて HDL (1.063—1.210g/ml) の分画を行ない, 3 つの亜分画を得たと報告している²⁹⁾。HDL₂, HDL₃ とともにこれらの 3 つの分画すべてを含んでいた。一方, Kostner らは, DEAE cellulose よりも DEAE-Sephacel がより分離能が良く, 6 つの分画を得た³⁰⁾。しかし, この方法では, 検体の稀釈の割合が大きいため十分な検索には不適当としている。

4) アフィニティークロマトグラフィー

a) ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

Apo E は Apo B レセプターに結合でき, 細胞内コレステロール代謝に Apo B 含有リポ蛋白 (LDL) とともに重要な役割を果たしている。Apo E 含有リポ蛋白を分画する方法として, ヘパリンとの結合特性を利用したヘパリンアフィニティークロマトグラフィーが注目されている。

リポ蛋白の分画法には超遠心法, 電気泳動法, 沈澱法等が広く用いられている。しかしこれらの方法にて分画されたリポ蛋白は細胞との相関の関係からみると必ずしも均一ではない。著者はリポ蛋白が動脈壁に沈着するときや, 各種の体細胞と結合する際に glycosaminoglycan 等を含む糖蛋白との結合が, 重要な役割を果たしていると考えられていることに着目し, リポ蛋白をヘパリンとの結合親和性の差異

により分画することを試みた³¹⁾。

Iverius の方法に従って、ヘパリンを活性化した Sepharose 4 B にカップリングさせた後、径 2.5 cm、高さ 10.0 cm のカラムに充てんした。ラット血漿超低比重リポ蛋白 (VLDL: $d < 1.006 \text{ g/ml}$), 低比重リポ蛋白 (LDL: $1.006 < d < 1.063 \text{ g/ml}$), 高比重リポ蛋白 (HDL: $1.063 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) を超速心法にて分離後 0.05M NaCl を含む 2mM sodiumphosphate buffer, pH 7.4 に十分透析し、上記カラムを用いて 4℃にて分析した。流出液は 2mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 0.05—1.0M NaCl の直線的勾配を用いた。流速約 50ml/時間にて、3.0 ml づつ分取し、流出パターンは 280nm における吸光度にて示した。

まずヘパリンと結合するリポ蛋白の代表として、LDL について検討した。正常ラット (ウィスター系雄性ラット、体重 250—300g) より早朝空腹時採血して得られた LDL、蛋白量 3.0 mg のヘパリン・セファロース、アフィニティークロマトグラフィー (ヘパリンカラム) を行なった。Fig. 4a に示すごとく、tube No 35, 0.25 M NaCl に頂点を有する 1 つのピークが認められた。即ちほとんどの LDL はヘパリンと結合し、void volume (tube No 12) に認められる非結合リポ蛋白は認められなかった。Fig. 4b は正常ラットより早朝空腹時採血して得られた HDL の流出像を示す。HDL 蛋白量として 6.0mg を分析した。void volume (tube No 12) に頂点を有するピークが認められたが、LDL に認められた tube No 35, 0.25M NaCl の位置には明らかなピークは認められなかった。即ちほとんどの HDL はヘパリンとは結合せず流出されると考えられた。正常ラットより早朝空腹時採血して得られた VLDL のヘパリンカラム流出像は Fig. 4cのごとくであった。VLDLトリグリセリド (TG) 量として 13.0mg を分析した。

第1のピークは、HDL で認められた様に void volume に認められ、ヘパリンと結合しな

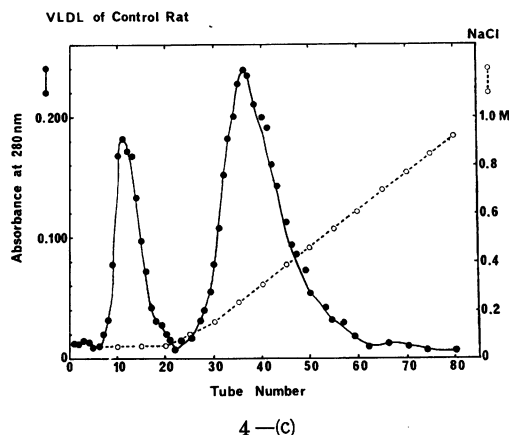
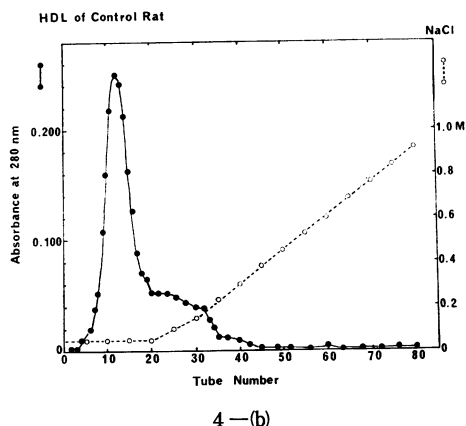
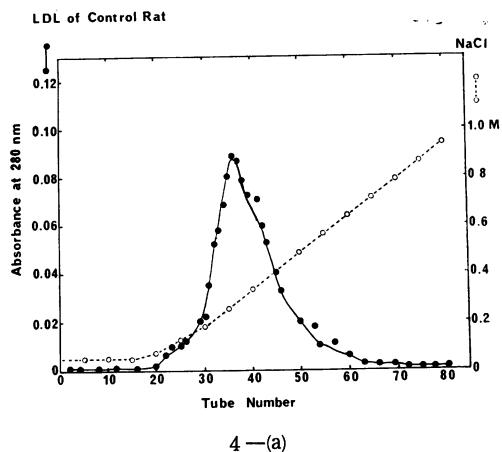


Fig. 4 Heparin-Sepharose 4B affinity chromatography of rat LDL (a), HDL (b) and VLDL (c)³¹⁾.

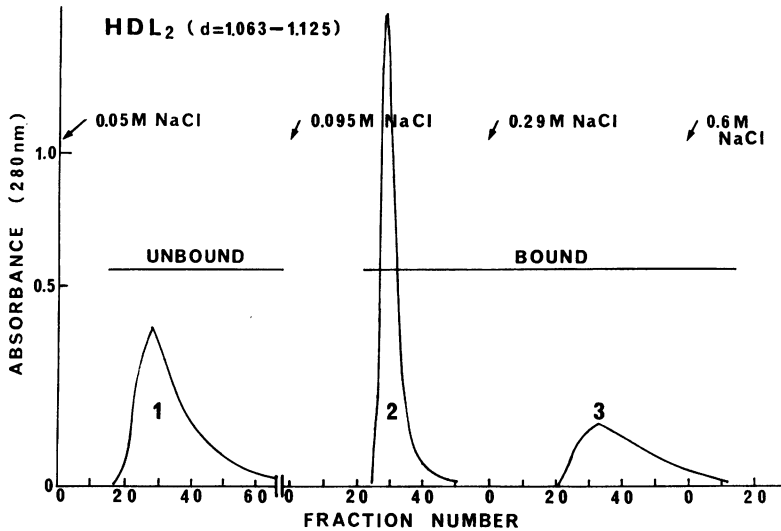


Fig. 5 Elution profile of human plasma HDL₂ ($1.063 < d < 1.125$ g/ml) by heparin-Sepharose affinity chromatography¹⁹.

いリポ蛋白であり、第2のピークはLDLで認められた様に0.25M NaClにて流出されるヘパリンと結合するリポ蛋白である。なお0.6M NaCl以上においてはリポ蛋白の流出は認められなかった。さらに heparin-Sepharose affinity chromatography を用いて HDL₂ をヘパリンとの親和性の相違により分画し、各分画を GGE にて分析した。heparin-Sepharose affinity chromatography の結果は Fig. 5 に示したごとくで、Weisgraber らの結果¹⁸⁾ とほぼ同様であった。即ち、HDL₂ は、ヘパリンと親和性を有さず 0.05M NaCl にて溶出される分画(分画1)、ヘパリンと親和性を有し 0.095M NaCl にて溶出される分画(分画2)、および 0.29M NaCl にて溶出される分画(分画3)に分かれた。Weisgraber らによれば、分画1, 2, 3はそれぞれ HDL₂ without Apo E, HDL₂ with Apo E, Apo B containing lipoproteins であり、各分画のアポ蛋白の分析でもほぼ同様の結果を得ている。そこで、この分画1, 分画2を GGE にて分析すると分画2, すなわち HDL₂ with Apo E と思われる分画は HDL₂ の

泳動像のうち泳動距離の小さい上方の部分だけが現われた形を呈しており、したがって分画2は HDL₂ のうち分子量の大きい部分を構成していることが判明した。この結果より計算したみかけ上の分子量は HDL₂ ($1.0 \sim 4.6$) $\times 10^5$, 分画1 ($1.0 \sim 3.3$) $\times 10^5$, 分画2 ($1.8 \sim 4.6$) $\times 10^5$ であった。Weisgraber らの GGE の結果においても HDL₂ with Apo E が HDL₂ without Apo E に比し分子量が大きかった。

Iverius は、ヒトリポ蛋白と glycosaminoglycan (Sepharose 4 B) との結合について報告した³²⁾。その成績によれば、LDL とともに VLDL も heparin, dermatan sulfate, heparan sulfate, chondroitin 4-sulfate と結合した。一方 HDL およびアセチル化した VLDL, LDL とは結合しなかった。そして、この結合は塩濃度、イオン強度により著明に影響されることより、Apo B の陽性荷電したアミノ基と glycosaminoglycan の陰性荷電グループとの結合が重要であると推測した。しかし hyaluronic acid とは VLDL, LDL, HDL のいずれも全く結合しなかった。

Iverius は, glycosaminoglycan の中でのリポ蛋白への結合親和性の強さは heparin > dermatan sulfate > heparan sulfate ≈ chondroitin sulfate > hyaluronic acid であると考えた。ヒト大動脈の細胞外組織に存在する glycosaminoglycan として, hyaluronic acid, dermatan sulfate, heparan sulfate, chondroitin 6-sulfate, chondroitin 4-sulfate が知られている。しかし, heparin や keratan sulfate の存在についての確証はない。また加齢とともに動脈壁の heparan sulfate, dermatan sulfate が増加すると報告されている。さらにリポ蛋白の動脈壁への蓄積にはリポ蛋白が dermatan sulfate 等と結合することが重要と考えられている。ヘパリンはさきに述べた様にリポ蛋白との結合に対して dermatan sulfate と同様の態度を示し, またリポ蛋白と最も強い結合親和性を有することより, ヘパリンカラムは動脈壁や細胞膜におけるリポ蛋白と glycosaminoglycan との結合様式を in vitro で検索する良いモデルと考えられる。

従来, ラット血漿リポ蛋白のヘパリンカラムの成績は主として HDL に注目し, 報告されている。Hay ら³³⁾ は, HDL はヘパリンとの結合において, 非結合分画と結合分画とに分けられることを初めて報告した。そしてアポ蛋白組成では両分画ともに Apo A-I, Apo E を含んでいたが, 結合分画で Apo E が相対的に Apo A-I に比し増加していることを示し, HDL のヘパリンとの結合に Apo E が重要な役割を果たしていることを示した。さらに Quarfordt³⁴⁾ も同様の成績を報告し, 非結合分画 (主として Apo A-I, 少量の Apo E を含む) は全 HDL の90%, 結合分画 (主として Apo E を含む) は10%を占めることを報告した。両報告では, Apo Bの関与については触れられていない。ヒト HDL についても, Weisgraber ら¹⁸⁾ はヘパリンカラムにて分画し, 非結合分画と結合分画の存在することを報告した。結合分画はさらに2分画に細分され, 1つは Apo E (または

E-A-II 複合体) を含む分画で, 他の1つは Apo B を含む分画 (Lp(a) に類似) に分画された。現在までのところ, (1) HDL with Apo E は90%が HDL₂ 分画に存在する。(2) 線維芽細胞の LDL receptor に LDL と競合的に結合する。(3) 肝細胞は HDL with Apo E の中のコレステロールエステルを HDL without Apo E の10倍多く取り込む。(4) LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase) の基質としては, HDL without Apo E よりその initial reaction rate, Vmax とともに小さいことなどが解明されている。近年 HDL の抗動脈硬化作用について数多くの報告がみられるが, この Apo E を含有する HDL が重要な役割を果たしていると考えられ, ヘパリンカラムは Apo E 含有 HDL の分画に非常に有力な手段であると報告している。

b) コンカナバリン (Con) A アフィニティークロマトグラフィー

McConathy ら³⁵⁾ は, 糖蛋白が Con A と結合する性質を利用して, Apo B 含有リポ蛋白 (LpB) を Con A アフィニティークロマトグラフィーにより分画する方法を報告した。Con A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) にリポ蛋白をアプライし, 0.02M Tris (pH7.2), 1.0M NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ buffer にて流出すると, LpB は Con A カラムに吸着し, 流出されず, その他のリポ蛋白は流出される。Con A カラムに吸着した LpB は, 0.2M α -D-methyl-glucoside を含む上記 buffer にて流出することができる。この様にして LpB の純化に用いられた。著者も Apo B の免疫学的定量等のために用いるために, LDL₂ (1.030 < d < 1.050 g/ml) 分画を Con A カラムにアプライし LpB を純化した³⁶⁾。

Mitamura は, Con-A アフィニティークロマトグラフィーによる HDLc (cholesterol-induced HDL) の分画法を報告した³⁷⁾。HDLc は動物 (ヒト, イヌ, ブタ, サル) を高コレス

テロール食にて飼育すると出現する Apo E に富むリポ蛋白で超遠心法によるリポ蛋白の分画では LDL 分画にもおよぶ (1.030—1.110 g/ml)。HDLc と LDL は超遠心法によっては分離し難く, Mahley らは, Geon-Pevikon ブロックを支持体とする電気泳動法により分画している⁸⁸⁾。しかし, この方法は必ずしも容易ではないとされている。三田村の方法を略記する。まず総リポ蛋白分画 ($d < 1.225$ g/ml) を Bio-Gel A 15m カラムにて分画すると peak I に LDL に属するリポ蛋白分画が得られる。この peak I を Con A カラムにかけると, 非結合分画と結合分画が得られた。これらの分画の脂質, 蛋白組成, 粒子サイズの検討より, 非結合分画は Mahley らの報告している HDLc の性状と類似しており, HDLc と考えられ, 結合分画は LDL (LpB) と考えられた。

この様に Con A アフィニティークロマトグラフィーもリポ蛋白の細分画法の一方法として有用と考えられる。

III. ま と め

HDL の抗動脈硬化作用の機序については未だ必ずしも明確にされていない。今後, HDL のどのような亜分画が最も重要な意義を有するかについてより詳細に検討されねばならない。そのためには HDL の細分画法について, その機能を加味した分画法が考察されることが肝要と考える。また, 現在行なわれている細分画法についてもより一層臨床応用し, 各種病態における動態をさらに明らかにされることが期待される。

謝辞: 竹田亮祐教授の御校閲を深謝致します。

文 献

- 1) R. W. Mahley and K. H. Weisgraber : *Reports of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop*, ed. by K. Lippel, NIH publication No.79-1661, p. 356 (1979)
- 2) F. T. Lindgren, L. C. Jensen and F. F. Hatch : *Blood Lipids and Lipoproteins : Quantitation, Composition and Metabolism*, ed. by G. J. Nelson, Wiley-Interscience, New York, p. 181 (1972)
- 3) 八杉忠男, 佐々英一, 木下毅他 : 最新医学 **27**, 424 (1972)
- 4) D. W. Anderson, A. V. Nichols, T. M. Forte et al : *Biochim. Biophys. Acta* **493**, 55 (1977)
- 5) H. G. Wilcox and M. Heimberg : *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 424 (1968)
- 6) J. R. Patsch, S. Sailer, G. Kostner et al : *J. Lipid Res.* **15**, 356 (1974)
- 7) G. M. Kostner, J. R. Patsch, S. Sailer et al : *Eur. J. Biochem.* **45** : 611 (1974)
- 8) P. Laggner, H. Stabinger and G. M. Kostner : *Preparative Biochem.* **7**, 33 (1977)
- 9) W. Pasch, G. Schonfeld, A. M. Gotto et al : *J. Biol. Chem.* **255**, 3178 (1978)
- 10) J. Shepherd, C. J. Packard, J. M. Stewart et al : *Clin. Chim. Acta* **101**, 57 (1980)
- 11) J. R. Patsch, D. Yeshurum, R. L. Jackson et al : *Am. J. Med.* **63**, 1001 (1977)
- 12) J. Shepherd, C. J. Packard, J. R. Patsch et al : *J. Clin. Invest.* **63**, 858 (1979)
- 13) C. B. Blum, R. I. Levy, S. Eisenberg et al : *J. Clin. Invest.* **60**, 795 (1977)
- 14) T. G. Redgrave, D. C. K. Roberts and C. E. West : *Anal. Biochem.* **65**, 42 (1975)
- 15) J. R. Foreman, J. B. Karlin, C. Edelstein et al : *J. Lipid Res.* **18**, 759 (1977)
- 16) M. J. Chapman, S. Goldstein, D. Lagrange et al : *J. Lipid Res.* **22**, 339 (1981)
- 17) B. H. Chung, T. Wilkinson, J. C. Geer et al : *J. Lipid Res.* **21**, 284 (1980)
- 18) K. H. Weisgraber and R. W. Mahley : *J. Lipid Res.* **21**, 316 (1980)
- 19) 笈田耕治, 中井継彦, 玉井利孝他 : 動脈硬化 **9**, 609 (1981)
- 20) J. J. Pratt and W. G. Dangerfield : *Clin. Chim. Acta* **23**, 189 (1969)
- 21) S. M. John and C. Waterhouse : *J. Lipid Res.* **13**, 193 (1972)
- 22) G. J. Bautovich, M. J. Dash, W. J. Hensley et al : *Clin. Chem.* **19**, 145 (1973)
- 23) D. W. Anderson, A. V. Nichols, S. S. Pan et al : *Atherosclerosis* **29**, 161 (1978)

＜特集＞血漿リポ蛋白の細分画とその臨床的意義

- 24) A. V. Nichols, P. J. Blanche, R. M. Krauss et al : *Report of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop*, ed. by K. Lippel, NIH publication No. 79-1661, p. 303 (1979)
- 25) P. J. Blanche, E. L. Gong, T. M. Forte et al : *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 408 (1981)
- 26) G. B. Bon, G. Cazzolato and P. Avogaro : *J. Lipid Res.* **22**, 998 (1981)
- 27) A. M. Scanu, C. Edelstein and L. Aggerbeck : *Ann. NY Acad. Sci.* **209**, 311 (1973)
- 28) G. M. Kostner and A. Holasek : *Biochim. Biophys. Acta* **488**, 417 (1977)
- 29) B. Rubenstein : *Atherosclerosis* **33**, 415 (1979)
- 30) G. M. Kostner and P. Laggner : *Report of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop*, ed. by K. Lippel NIH publication No. 79-1661, p. 343 (1979)
- 31) T. Nakai, K. Oida, T. Tamai et al : *Artery* **10**, 150 (1982)
- 32) P. H. Iverius : *J. Biol. Chem.* **247**, 2607 (1972)
- 33) C. Hay, J. A. Rooke and E. R. Skinner : *FEBS Lett.* **91**, 30 (1978)
- 34) S. H. Quarfordt, R. S. Jain, L. Jakoi et al : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 786 (1978)
- 35) W. J. McConathy and P. Alaupovic : *FEBS Lett.* **41**, 174 (1974)
- 36) T. Nakai, T. Tamai, K. Oida et al : *Jpn. J. Clin. Chem.* **11**, 71 (1982)
- 37) 三田村健 : 脂質生化学研究 **22**, 61 (1980)
- 38) R. W. Mahley and K. S. Holcombe : *J. Lipid Res.* **18**, 314 (1977)
- 39) 中井継彦, 笈田耕治, 玉井利孝他 : 動脈硬化 **9**, 597 (1981)