

血 清 脂 蛋 白 の 研 究

第 3 編

濾紙電気泳動法による脂蛋白分割中の
各種脂質の定量的研究

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〕

前編¹⁾に於て濾紙電気泳動法による血清脂蛋白の定量法について検討し、並に脂蛋白の仮面性について述べた。本編に於ては更に脂蛋白中の α 分割、 β 分割に於ける脂質の種類別含有量の測定法を考案し、化学的分析値と比較検討した結果について述べる。

脂蛋白は血清中に於ては脂質の運搬者としてのみ存在するとは思えないが、脂質の蛋白質への結合乃至は細胞への移行は比較的自由に行われるようである。即ち最近の研究では血漿中のコレステロールと赤血球のそれとの間の量的平衡関係は 37°C 、1時間で50%に達すると云われる²⁾。従つて血漿中の脂質の変動は細胞の代謝と関連してかなり目まぐるしく動いているものと考えられる。種々の疾患の場合、血清のコレステロール、磷脂質の含有量が変化する事が知られている³⁾⁴⁾⁵⁾が、これ等の変化が病的細胞代謝と密接に関係しているであろう事は疑問の余地がない。その機構がどのようなものであるかについてはなお充分明かではないが、その解明には先づ脂蛋白の定量的研究から出発せねばならない事は明かである。脂蛋白分割の化学的定量法はGofman⁶⁾が超遠心分離法によりその沈降度から分割定量を行っているのを始め、Cohn et al.⁴⁾⁷⁾のアルコール沈澱法による分離、その分離法を利用した Barr⁸⁾、Russ³⁾等の各分割中の脂質の定量法等がある。その他 Blix 等⁹⁾は電気泳動的にその分割を見ており、又 Kunkel & Slater¹⁰⁾は Zone Electrophoresis による分析法により観察している。

一方これ等と異つて非常に微量な材料で分析を可能にする濾紙電気泳動法に於ては、Swahn⁵⁾がガラス板の間に10枚の濾紙を挟み泳動し、各分割を抽出し脂質を定量している。Chapin¹¹⁾も血清を濾紙電気泳動し、アセトンで抽出した後 S. B. B 染色液で

染色しその定量値を磷脂質の測定値としている。しかもこの濾紙法で得られた結果は Cohn⁴⁾、Kunkel & Slater¹⁰⁾、Russ³⁾等の行つた化学的分析値と非常に近い値を示している。

著者はこの濾紙電気泳動法により、コレステロール、磷脂質を半定量的に測定する方法を考案しその実測値について検討を加えた。更にそれらの抽出性より脂蛋白分子内の脂質と蛋白の間の結合機構の究明を試みた。

材料及び方法

材料は冬期空腹時の家兎より、前編に述べた如く溶血の起らないように採血した血液から分離された血清を使用した。

脂質の定量は脂質検出のための S. B. B 染色液（第2編¹⁾参照）を使用し、第2編¹⁾に述べた方法に準じて行つた。即ち脂肪を除いた Carl Schleicher の濾紙（ $30 \times 4 \text{ cm}^2$ ）4枚を同一泳動器で直列に繋ぎ、ペロナール緩衝液（ $\text{pH } 8.6$ 、 $\mu=0.1$ ）を溶媒として 110 V 、 0.3 mA/cm で約7時間同時に泳動した。使用血清は各々 0.04 cc で、泳動後 100°C 、20分熱処理を行い4枚の泳動濾紙に夫々次の4種の操作を施した。

A) Bromphenol blue で蛋白質の染色を行う（蛋白の定量用）（図1，A）。

B) そのまま S. B. B 染色液で染色する（総脂質量測定用）（図1，B）。

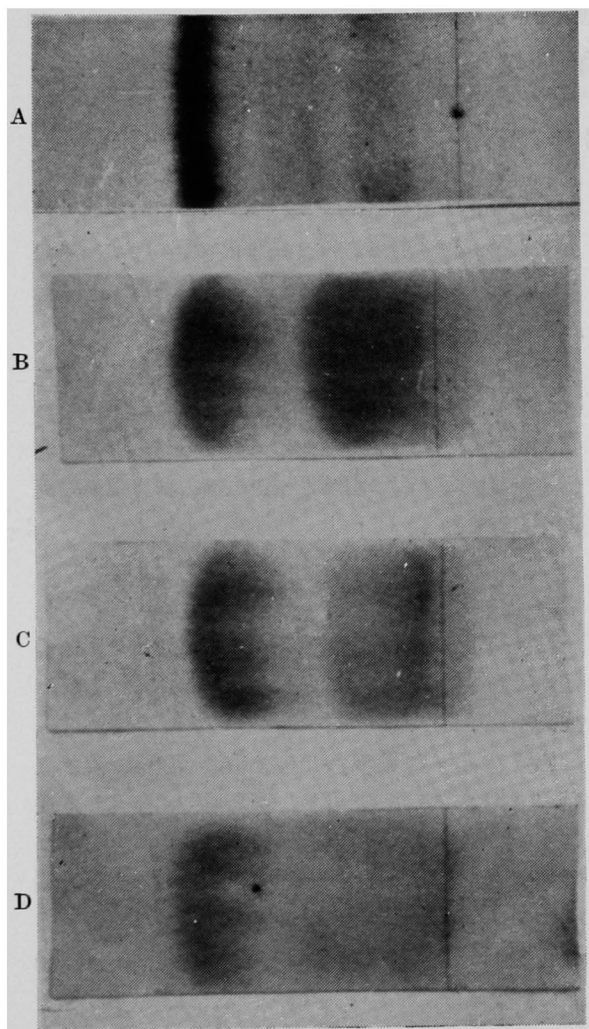
C) 塩化マグネシウム飽和の沸騰アセトンで10分宛3回 Soxhlet の抽出装置を使用して抽出後、S. B. B 液で染色する（図1，C）。

D) 先づアルコール（約 50°C ）で1時間抽出し、更にエーテル（約 30°C ）で1時間抽出した後 S. B. B

で染色する(図1, D)。

S. B. B 染色液は60%エタノール中に S. B. B を飽和に溶かし, 100°C, 5 分間加熱したものを冷却, 2~3 日間放置後濾過した液である。之で12~15時間染色し60%エタノールで15分洗滌する。

図1 血清蛋白泳動像(B. P. B. 染色)及び各種有機溶媒処理後の家兎血清脂蛋白電気泳動像(S. B. B 染色)

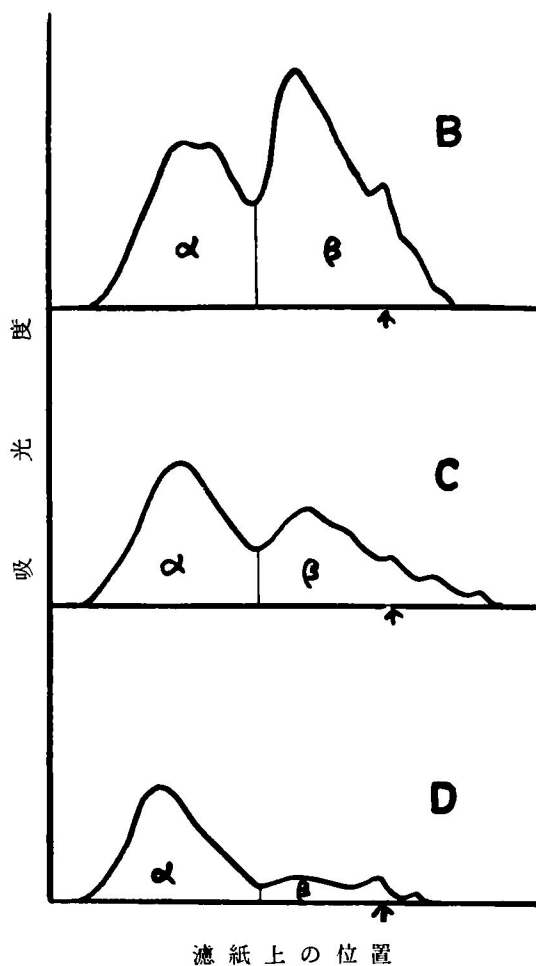


- A 血清蛋白
B 無 処 理
C 沸騰アセトン30分処理
D 沸騰アセトン30分
アルコール 60分
エーテル 60分処理

これ等各々の濾紙はデンストメーターにかけて吸光度曲線を求め, プラニメーターでその面積の測定を行いその積分値を測定値とした(図2)。これ等の測定値から各脂質量は次のようにし求める事が出来

る。

図2 脂蛋白の定量曲線(家兎)



- B…無処理 B…総脂質
C…沸騰アセトン30分 B-C…アセトン可溶性脂質(C.N.)
D…沸騰アセトン30分 アルコール 60分 C-D…磷脂質(P)
エーテル 60分 D…その他の脂質(O)

- B……………総脂質量
B-C…………アセトン可溶性脂質
C-D…………アルコール・エーテル可溶性脂質
D…………アルコール・エーテル不溶性脂質

更に脂蛋白の蛋白変性に伴う脂質抽出性の変化を見るために次のような実験を行つた。即ち一般に磷脂質抽出液とされている Bloor 試薬(30°C)で血清を2時間の間に3回抽出し, その蛋白部を減圧乾燥し再び生理的食塩水で溶解したものについて行つた電気泳動像の S. B. B 染色度と, 未抽出血清の電気泳動濾紙を 100°C, 20 分処理した後 Bloor 試薬或はアルコール, エーテルで抽出したものの

S. B. B 染色度とを比較した。勿論この場合蛋白量は同一濃度に調整して実験を行った。

実験結果

1) 総脂質量

既に発表した如く、著者の方法では総脂質の絶対量の測定は不可能であるが、その近似値と α 、 β 脂

蛋白の比の変化を知る事は可能である。之を実際に測定して見ると季節によつてかなり大きい変動があるが、著者がこの実験を行った11月～2月迄の期間では表1に示す如く、 $\alpha : \beta = 42.3 : 57.7$ であつた。なお表示した値は家兎8匹について行つた平均値を示すものである(図2, 表1)

表 1 アセトン可溶性脂質 (C. N.)

Total Lipid per in fraction		C. N. per in Total Lipid	C. N. in α fraction			C. N. in β fraction		
α	β		/Total C. N.	/ α Lipid	/Total L.	/Total C. N.	/ β Lipid	/Total L.
42.3	57.7	40.6	20.4	19.6	8.3	79.6	55.9	32.3

(L. = Lipid)

2) アセトン可溶性脂質

56°Cのアセトンで10分宛3回抽出する事により、S. B. B 染色度は大いに变化する。即ちアセトン可溶性脂質は血清中では主としてコレステロールで中性脂質も之に入る。総脂質の約40.6%を示し、 α で8.3%, β で32.3%, $\alpha : \beta = 20.4 : 79.6$ であり、それ等は α 脂質の19.6%, β 脂質の55.9%を示している。即ち β 分割にはアセトン可溶性脂質を多量に含み、実験値に見られる β 分割の大きな変動は、主としてこのアセトン可溶性脂質の変動に由来するものと思われる。なおアセトンによる磷脂質の溶出は、塩化マグネシウムの飽和により防止される事が知られている¹⁰⁾ので上述の様な操作により磷脂質が失

われる心配はない。

3) アルコール、エーテル可溶性脂質

これは上記2)のアセトン可溶性脂質を除いた後、アルコール、エーテルで抽出される脂質で主として磷脂質に相当する。この際アルコールのみでは抽出が僅かであるが、エーテルによつてよく抽出される。なおエーテルのみではその抽出性が悪い。又アセトンの処理なく直接エーテルのみで抽出しても殆んど抽出される脂質がない事は、本法で見られる脂蛋白が蛋白質とよく結合している事を示す。即ち脂蛋白の性質を示している。扱てこのアルコール、エーテル抽出部分は主としてレシチン、ケファリンでその値は表2の如く総脂質の27.9%で α が12.2%, β が

表 2 アルコール、エーテル可溶性脂質 (P)

P per in Total Lipid	P in α fraction			P in β fraction		
	/Total P	/ α Lipid	/Total L.	/Total P	/ β Lipid	/Total L.
27.9	43.7	28.8	12.2	56.3	27.2	15.7

15.7%を示し $\alpha : \beta = 43.7 : 56.3$ である。又 α 脂質の28.8%, β 脂質の27.2%を示す。かくの如く α 分割の量がこのように少量であるのは、5)に於て述べる如く、熱処理によつてアルコール、エーテル可溶性脂質の一部が不溶性になるためである。

4) アルコール、エーテル不溶性脂質

この脂質についてはどのようなものが存在するか明かでないが、Chapinはこの脂質をもアルコール、エーテル可溶性脂質と同一視して磷脂質として測定している。しかし予め Bloor 試薬で脂質を抽出した血清蛋白の電気泳動像にも、なお S. B. B 染色物質が残存している事から、理論的にも之を磷脂質の

みとする事には不合理である。しかし5)に於て述べる如く、100°Cの熱処理により元来アルコール、エーテル可溶性脂質であつたものがその抽出性を減じて不溶性になりうるので、この中にも磷脂質が含有されている事は明かである。この脂質は総脂質の31.5%を示し、 α が21.8%, β が9.7%で $\alpha : \beta = 69.2 : 30.8$ である。又 α 脂質中の51.6%即ち半量を示し、 β 脂質では16.9%を示す(表3)。

5) 100°C, 20分処理による脂質抽出性の減退

予め Bloor 試薬で脂質を抽出した血清蛋白の濾紙電気泳動像が示す S. B. B 染色物質は、大部分が磷脂質以外のものと考えられる(非常に強い結合や、蛋

表 3 アルコール, エーテル不溶性脂質 (O)

O per in Total Lipid	O in α fraction			O in β fraction		
	/Total O	/ α Lipid	/Total L.	/Total O	/ β Lipid	/Total L.
31.5	69.2	51.6	21.8	30.8	16.9	9.7

L はLipid

白質にまきこまれた形のものも考えられ, Bloor 試薬で完全に磷脂質が抽出出来るとの考は危険である。之に対して, 濾紙上に血清蛋白を電気泳動した後100°C, 20分加熱処理をして, Bloor 試薬或はアルコール, エーテルで抽出した泳動濾紙の示す S. B. B 染色性は, 同一材料の同一蛋白量に於て前者の約1.9倍高い値を示す。この事は熱処理によつて脂質が蛋白との結合を強め, 不可逆的にエーテル, アルコール不溶性となるためと思われる。しかもその傾向が α で大である。之は前述の如く, この不溶性脂質中に主として磷脂質が混入している事を示す。又同時に Chapin が示した磷脂質の定量値が正しくない事を意味する。しかし熱処理によつて不溶性になる部分を除いても, なお特に α 分割に不溶性脂質がかなり認められる。この事は α 脂蛋白分割に極めて強固な結合を有する脂質が存在する事を示すものと考えられる。

考 案

擬て血清脂蛋白のアセトン可溶性部分はコレステロールが主体をなしており, 家兎血清では総脂質の約40%を示している。之は Zone Electrophoresis で Kunkel & Slater¹⁰⁾ が示した人血清の値に近い。しかも Lever¹²⁾, Russ³⁾, Pearsall¹³⁾ 等が示した如く, この脂質の α と β との比は年令による差はあるが略々1/3乃至1/4の間にあり, 著者の成績とよく一致する。

次にアセトンによる抽出後エーテル, アルコールによつて抽出される部分は磷脂質が主体で, 主としてレシチン, ケファリンである事は脂質の一般的性格から明かである。この部分の α と β との比は略々2/3で人血清の場合 Russ³⁾ 等の結果に一致する。又以上の2種の脂蛋白即ちコレステロール(C)と磷脂質(P)との比を各分割について見ると, α 脂蛋白ではC/P=20/29 $\div$ 0.7で Russ³⁾ の示した0.81~1.02の値に, β 脂蛋白ではC/P=56/27 $\div$ 2.1で Russ³⁾ 等の示した2.2~2.5にやや近い。即ち家兎に於ても人とこれ等の値はほぼ等しいと云える。

アルコール, エーテル不溶性脂質は前述の如く, 之は主として極性の強い磷脂質の如きものが乾燥による蛋白変性に伴つて蛋白との結合が強化されたために残つたものと考えられ, その大部分は磷脂質に属するものと見て差支えない。只之が α 分割に特別に多く出現し, β 分割に少い事から, 磷脂質の大部分は α 分割の蛋白と結合しているものと考えられる。

次に γ グロブリン分割の脂質は James²⁾ が人に於て分析した結果によれば, コレステロールと磷脂質の比が3.7乃至5.7で β 分割のそれが2.2乃至2.5であるのに比してコレステロールが多い。しかしその総脂質に対する比は僅か3%であり²⁾, 泳動像の上では明確に β 分割と分離する事が困難で, そのため β 分割と一緒にした。

擬て溶媒に対する純脂質の可溶性と脂蛋白よりの脂質抽出性を比較すれば, 脂質と蛋白の結合状態をある程度窺う事が出来る。Macheboeuf²⁾ によれば, エタノール9.6%を含むエーテルで血清の脂質を抽出する場合, 完全抽出(是は脂質の全部を抽出する事は出来ない)を行うに2時間を要したが, エーテル中のエタノールの濃度を下げ7.7%にすると10時間を要し, 6.7%にて22時間, 5.75%で45時間を要した。この事は疎水性溶媒による抽出が困難である事を示しており, 脂蛋白が単に脂質の無極原子団と蛋白のそれとが融合しているような状態ではなく, 電気的な極性結合の存在を考えさせる。或は両者の間に水が入つて結合に関与しているかも知れない。即ち蛋白のアミノ酸残基の疎水原子団に脂質の脂肪酸の尾部が接している他に, 脂質の極性群が水分子を介し又は直接に蛋白の極性原子団に結合しているような構造と考えられる。McFarlane¹⁴⁾ によれば, -60°Cに於ては, アルコールを含まないエーテルによつて容易に脂蛋白の脂質を抽出する事が出来る。この事は低温に於ける荷電の低下乃至氷結晶の形成による脱水が関係していると考えられる。神田等¹⁵⁾¹⁶⁾ によれば凍結乾燥組織からは極めて容易に脂質が抽出されるので, やはり水分子が脂質と蛋白の極性分子の間に介在すると考えた方が妥当である。

Harvard²⁾ は単純な乾燥により、脂蛋白の脂質の不可逆的な不溶性が起る事を見ており、神田¹⁵⁾¹⁶⁾ も同様な現象を報告している。この事は脱水によつて蛋白と脂質の極性基が直接結合する事を示唆している。

一方又本実験に示した如く、乾燥は著しく脂蛋白の S. B. B 染色性の低下を示す。この事は蛋白膜が脂質の表面に形成される結果と考えられる。110°C, 20分の熱処理が脂蛋白の脂質の一部の抽出性を減少する一方 S. B. B 染色性を増す事は、蛋白膜の破壊を一方に起し他方脂質と蛋白の結合を強化するという事によつて理解されよう。

結 論

濾紙電気泳動法により血清脂蛋白を測定した。冬期正常家兎で α 脂蛋白と β 脂蛋白の比は42.3 : 57.7であつた。又泳動濾紙を110°C, 20分処理を行い

セトン抽出、アルコール、エーテル抽出を試みて後 S. B. B 染色を行い、アセトン可溶性脂質（主としてコレステロール）、アセトン不溶性脂質、アルコール、エーテル可溶性脂質（ケファリン、レシチン等の磷脂質）、アルコール、エーテル不溶性脂質等に分けて測定した。その結果 α 脂蛋白には磷脂質、 β 脂蛋白にはコレステロールが多い事が示された。又種々の処置による抽出性の変化から、脂蛋白は脂質と蛋白の極性原子団の間に水分子が介入して結合が起つているのであろう事を示唆した。

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ました妹尾教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 戸倉又晴：岡山医学会雑誌，本巻，本号 第二編，1951.
- 2) James, L. : Blood cells and plasma proteins, P. 337, Academic Press. N. Y. 1953.
- 3) Russ, E. M., Eder, H. A. and Barr, D. P. Amer. J. Med. 11, 468, 1951.
- 4) Cohn, E. J. et al. : J. Amer. Chem. Soc. 72, 465, 1950.
- 5) Swahn, B. : Scand. J. Clin. Invest. 5-suppl. 9, 1953.
- 6) Gofman, J. W., Lindgren, F. T. and Elliott, H. A. : J. Biol. Chem. 179, 973, 1949.
- 7) Cohn, E. J. et al. : J. Amer. Chem. Soc. 68, 459, 1946.
- 8) Barr, D. P. et al. : Amer. J. Med. 11, 480, 1951.
- 9) Blix, G., Tiselius, A. and Svensson, H. : J. Biol. Chem. 137, 485, 1951.
- 10) Kunkel, H. G. and Slater, R. J. : J. Clin. Invest. 31, 677, 1952.
- 11) Chapin, M. A. : J. Lab. Clin. Med. 47, 386, 1956.
- 12) Lever, W. F. et al. : J. Clin. Invest. 30, 99, 1951.
- 13) Pearsall, H. R. and Chanutin, A. : Amer. J. Med. 7, 297, 1949.
- 14) Mac Farlane, A. : Nature 149, 439, 1942.
- 15) 内海耕健：医学と生物学 41, 226, 1956.
- 16) 神田三部：岡山医学会雑誌 68, 2019, 1956.

Studies on Serum Lipoprotein

3. Quantitative and qualitative estimation of lipids found in the fractions of serum protein by electropaperchromatography

By

Mataharu TOKURA

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

In rabbit serum it has been found that the quantitative ratio between those lipids found in α and β globulin fractions was 42.3/57.7 (the value obtained in winter). By estimating the quantity of lipids after treating with various solvents, acetone, ethanol, ether and ether-alcohol, and staining with S.B.B, it has been proved that the lipids found in α -globulin fraction are mainly of phospholipids, cephalin, lecithin and others and those of β -globulin fraction are mainly of cholesterol and its esters.
