

## セルロースアセテート膜電気泳動法による 血清リポタンパク質の分析条件の検討

堀江 信之

### Separation and Detection of Serum Lipoproteins by Electrophoresis on Cellulose Acetate Membrane

Nobuyuki HORIE

#### 緒 言

電気泳動は、生体高分子を分析する標準的な方法として広く用いられている。たんぱく質の電気泳動は、分析するたんぱく質の状態（未変性、変性状態）、分離に用いられる媒体などで分類されるが、分析法としては、分子量を測定する方法としてSDSポリアクリルアミド電気泳動が広く用いられている。この方法は、たんぱく質をSDS存在下、変性状態でポリアクリルアミドゲル中で電気泳動する方法であり、分子量の差による高分解能の分離が可能である。一方、未変性状態で分離する方法としては、たんぱく質の表面電荷での分離が可能な等電点電気泳動法が広く用いられている。未変性状態でのたんぱく質の電気泳動は、たんぱく質の立体構造や、表面電荷など、たんぱく質の生理的な機能と密接にかかわる性質でたんぱく質を分離できる可能性がある半面、一般には高い分解能が得られないため、等電点電気泳動を除くと現在ではあまり用いられなくなっている。

セルロースアセテート膜電気泳動法によるたんぱく質の分析は、ポリアクリルアミドゲルのような媒体の調製の必要がなく、また、たんぱく質を未変性で分析するため、生体での性質を反映させた分析が可能である。血清たんぱく質のセルロースアセテート膜電気泳動法による分析は、アルブミン分画とグロブリン分画を迅速に分離定量できることから、臨床検査でも用いられており<sup>1,2)</sup>、医療系の教育課程での学生実験にも広く取り入れられている。血清には、血清アルブミンや、免疫グロブリンなどのたんぱく質のほか、脂質を含むリポタンパク質も多く含まれている。血清中のリポタンパク質の存在様式は、脂質代謝に関連した疾病の診断にも使われることから、リポタンパク質の分析も、医療系の学生実験などにおいて重要な項目と考えられる。リポタンパク質に含まれるコレステロールの分析については、酵素法などによる簡便な分析法も知られている。しかし、リポタンパク質そのものの分析法で、学生実験で行えるような方法については、あまり報告されていない。

血清中のリポタンパク質の分析については、セルロースアセテート膜電気泳動法による分析<sup>3-5)</sup>、アガロース電気泳動による分析<sup>6)</sup>が報告されている。現在臨床検査としても用いられているのは、アガロースゲル電気泳動法を用いたものであり、半自動化が可能な装置も販売されているが<sup>7)</sup>、学生実験に取り入れるには、経済的な観点から不向きと考えられる。また、セルロースアセテート膜電気泳動法による分析の報告についても、検出方法の簡便さや再現性については問題があり、学生実験に適した方法については報告されていない。今回、脂質染色

法の一つであるSudan Red 7Bによる染色を用いて、セルロースアセテート膜電気泳動法による血清中のリポタンパク質の分析法について検討し、学生実験にも使用できる条件を見出すことができたので報告する。

## 方 法

### 1. 材料

試料としては、和光純薬より発売されているコントロール血清ワコー I, II および脂質コントロール血清セットを用いた。コントロール血清ワコーは血清の臨床検査機器のコントロール試料として販売されている試薬であり、健全なヒト血清を混合したものにいくつかの臨床検査で測定される酵素を加えたもので、参照のための臨床検査項目の測定値が添付されている。測定値の異なる資料として、2種類の製品 (I, II) が市販されている。脂質コントロール血清セットは、同じく、臨床検査機器のコントロール用に市販されている試薬であり、健全なヒト血清を混合して作成されている点はコントロール血清ワコーと同様であるが、脂質測定用のコントロール試料として用いるために、LDLコレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリドなど脂質に関連した臨床検査項目の測定値が添付されている。

セルロースアセテート膜はザルトリウス社製 (Sartorius 11200 Series Cellulose Acetate) を用いた。電気泳動装置としては、ADVANTEC社製 EPC1054AA型電気泳動装置を用いた。また、移動用緩衝液は0.06M バルピツールNa緩衝液 (pH8.6, 和光純薬) を用いた。脂質染色に用いた、Sudan Red 7BはSigma-Aldrich社製を用いた。そのほかの試薬は和光純薬 (株) より購入した。

### 2. 方法

#### (1) 電気泳動の操作

セルロースアセテート膜を1cm×6cmのストリップに切断し、泳動用緩衝液 (0.06M バルピツールNa緩衝液, pH8.6) で湿らせたのち、電気泳動装置にセットした。血清試料は、あらかじめ、100 $\mu$ Lあたり、1 $\mu$ Lの、1%ブロムフェノールを1%酢酸に溶解した色素液を添加した。血清たんぱく質の分析では血清試料1 $\mu$ Lを、リポタンパク質の分析については、血清試料2 $\mu$ Lをストリップの端に添付し、1ストリップあたり、0.8Aの電流値で、定電圧の条件で、約40分間電気泳動を行った。この時の電圧は、100-110Vであった。

#### (2) 染色方法

泳動後、たんぱく質の染色については、6%のトリクロロ酢酸に0.8%ポンソー3Rを溶解した染色液に1分間浸し、その後、1%の酢酸溶液中で、1時間から、一晚脱色を行った。脂質染色については、0.28%のSudan Red 7Bのメタノール溶液と1M NaOH溶液を使用直前に3:1で混合して染色液を作成し、その中に、1時間から一晚浸して脂質を染色した。この方法での脂質染色では、バックグラウンドがほとんど染色されず、脱色操作は不要であった。

#### (3) 定量方法

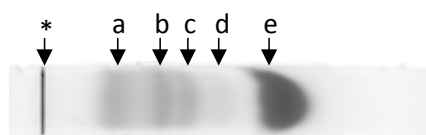
染色後、たんぱく質の染色操作を行ったセルロースアセテート膜は、乾燥したのち、キシレンで透明化し、デンスitomーターを用いて、たんぱく質の定量を行った。脂質染色の操作を行ったセルロースアセテート膜は、そのままグリセロール:メタノール=3:1の溶液につけ、表面についた色素の沈殿物を除いたのち、光学スキャナーを用いて画像をコンピュータに取り込

み、ImageJ<sup>8)</sup>を用いて、染色されたりポタンパク質を定量した。

## 結果

### 1. 血清中のアルブミン分画とグロブリン分画の分析

セルロースアセテート膜を用いた血清たんぱく質の分析は、臨床検査としても行われており、医療系の学生実験でも取り上げられることが多い。典型的なセルロースアセテート膜の染色像を図1に示す。血清たんぱく質由来の、アルブミン分画、 $\alpha$ 1-、 $\alpha$ 2-、 $\beta$ -、 $\gamma$ -グロブリン分画のバンドが観察された。ボンソーRを用いた染色では、染色時の色の濃さがほぼタンパク量に比例することから、デンストメーターを用いた簡易定量が可能である。デンストメーターでの測定の前線下面積より、全体のたんぱく質中での各分画の比率およびアルブミン/グロブリン比(A/G比)を計算することができる。コントロール血清Iについて、6回の測定を行った結果を表1に示す。アルブミン分画の比率は、66.29(SD 0.54)、A/G比は1.97(SD 0.05)であった。ヒト血清中の血清アルブミンの比率は約60%であり、セルロースアセテート膜電気泳動におけるアルブミン分画は、大部分が血清アルブミンであることから、アルブミン分画の比率は、ほぼ血清アルブミンの比率を示していると考えられる。また、健常なヒトのA/G比は1.0から2.0の間にあるとされており、測定結果は、健常なヒトの正常値と近い値となった。



泳動後、ボンソーRで染色を行った。\*、血清の添付位置；

a,  $\gamma$ -globulin fraction; b,  $\beta$ -globulin fraction; c,  $\alpha$ 2-globulin fraction; d,  $\alpha$ 1-globulin fraction; e, albumin fraction.

図1. ニトロセルロース膜電気泳動による血清蛋白質の分離

表1. ニトロセルロース膜電気泳動による血清蛋白質の定量

Fraction	Area(%)						Average	S.D.
	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	Ex.6		
Albumin	66.9	66.7	65.8	66.6	65.6	66.2	66.29	0.54
$\alpha$ 1-Globulin	2.9	3.3	3.4	3.3	3.0	3.1	3.14	0.20
$\alpha$ 2-Globulin	7.7	7.8	8.1	8.0	7.7	7.6	7.82	0.19
$\beta$ -Globulin	10.3	10.6	11.0	10.3	11.0	10.9	10.70	0.34
$\gamma$ -Globulin	12.2	11.6	11.7	11.7	12.8	12.2	12.05	0.44
A/G ratio	2.0	2.0	1.9	2.0	1.9	2.0	1.97	0.05

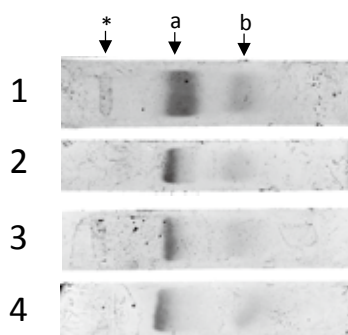
泳動後、ボンソーRで染色ののち、デンストメーターにて測定し、ピークごとの定量値を求めた。Ex.1~Ex.6, Control Serum 1 を試料と用いて分析した場合の各分画の面積比(%)と、A/G比を示す。S.D., Standard deviation.

### 2. 血清中のリポタンパク質の分析

血清リポタンパク質の染色については、使用直前に、0.28%の、Sudan Red 7Bのメタノール溶液と0.1N NaOH溶液を3:1の割合で混合し、その溶液にセルロースアセテート膜を、たんぱく質の付着している面が上になるように浸して行った。Sudan Red 7Bの溶液は、NaOH溶液と混合すると赤色から、やや黒みがかった暗赤色に変化し、次第に褐色の沈殿を生じた。一方、セルロースアセテート膜の脂質成分は、明るい赤色に染色され、また、溶液そのものは、透明に変化した。セルロース膜上の染色像は、染色操作開始後10分程度から現れ、1時間後に

は良好なパターンがみられた。さらに、染色時間を一晩に延長しても染色パターンに大きな変化は見られなかった。また、一晩染色液につけた場合でも、バックグラウンドはほとんど染色されず、良好な染色像が得られた。脂質染色に用いられる試薬として、Oil Red Oが知られている。Oil Red Oについても、今回用いたSudan Red 7Bと同じ条件で染色を試みたが、Sudan Red 7Bに比べ、バックグラウンドが高く、良好な染色像は得られなかった。また、Oil Red Oについては、グリセロール：メタノール=3：1の溶液で脱色が可能との記載がみられたため<sup>9)</sup>、Sudan Red 7Bでも脱色が可能か確かめる目的で同様の溶液での脱色を試みた。しかしながら、染色後のセルロースアセテート膜をグリセロール：メタノール=3：1の溶液につけたところ、表面に付着している褐色の沈殿はセルロース膜からはがすことができたが、染色されたバンドからも色素の流出が認められたため、この溶液で軽く洗う程度の処理が、良好な染色像を得るのに有効であると判断した。

染色したセルロースアセテート膜をグリセロール：メタノール（3：1）の溶液で処理したのちの染色像を図2に示す。セルロースアセテート膜による電気泳動では、リポタンパク質は $\alpha$ 分画、プレ $\alpha$ 分画、 $\beta$ 分画の3分画に分かれるとされており、 $\beta$ 分画には、HDLが、プレ $\alpha$ 分画、 $\alpha$ 分画には、それぞれ、VLDL、LDLが主に含まれているとされている<sup>4)</sup>。図2に示したように、今回の分析では $\alpha$ 分画と、 $\beta$ 分画の2本のバンドを含む染色パターンが得られた。次にこれらのバンドについて、光学スキャナーを用いて、画像をパーソナルコンピュータに取り込んだのち、ImageJを用いて、 $\alpha$ 分画および $\beta$ 分画の定量を行った。その結果を表2に示す。



泳動後、Sudan Red 7Bで染色を行った。1, Control Serum 1 WAKO; 2, Control Serum 2 WAKO, 3, 脂質コントロール血清1; 4, 脂質コントロール血清2。\*, 血清の添付位置; a,  $\beta$ -lipoprotein fraction; b,  $\alpha$ -lipoprotein fraction。

図2. ニトロセルロース膜電気泳動によるリポタンパク質の分離

表2. ニトロセルロース膜電気泳動によるリポ蛋白質の分析

Fraction	Area(%)									
	Lipid Control Serum 1		Av.		S.D.	Lipid Control Serum2		Av.		S.D.
$\alpha$ -Lipoprotein	35.0	32.1	31.9	33.0	1.7	31.1	40.8	38.8	36.9	5.1
$\beta$ -Lipoprotein	65.0	67.9	68.1	67.0	1.7	68.9	59.2	61.2	63.1	5.1
$\beta/\alpha$ ratio	2.7	2.1	2.1	2.3	0.3	2.2	1.4	1.6	1.7	0.4

泳動後、Sudan Red 7Bで染色ののち、デンスitomーターにて測定し、ピークごとの定量値を求めた。脂質コントロール血清セットに含まれるLipid Control Serum 1および2について、3回ずつ測定を行った。

## 考 察

セルロースアセテート膜電気泳動は、従来から血清たんぱく質の分析法として広く用いられている。医療系の教育機関での学生実験でも、生化学関連の分析法として取り上げられることが多く、本学の食物栄養学科の生化学実験でもセルロースアセテート膜電気泳動による血清たんぱく質の分析を取り入れている。ここでは、本研究で分析したリポタンパク質と泳動度を比較するため、ニトロセルロース膜電気泳動による血清たんぱく質の分析についても検討を行った。ボンソーRによる染色で、アルブミン分画及び $\alpha$ -から $\gamma$ -グロブリン分画の明確な分離パターンが得られ、ヘキサンの透明化ののち、デンストメーターでスキャンすることで、各ピークの定量化を行うことができた。同一の試料を繰り返し分析した場合の再現性は、最も大きなアルブミン分画のピーク割合について、C.V.値として0.81%であった。セルロースアセテート膜電気泳動は、同じくたんぱく質の分析法であるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動などに比べ、たんぱく質のバンド幅が広くまた、泳動時にバンドがゆがみやすいことを考えると、良好な再現性が得られていると考えられる。また、それぞれの分画の定量値からA/G比を求めた。A/G比の計算には、グロブリン分画の比較的小さいピークまで計算に入れるため誤差が出やすいが、ヒトの標準値である1.0から2.0の間に相当する結果を得た。試料として用いたコントロール血清ワコーは、臨床検査機器のコントロール用に市販されているものであり、健全なヒトの血清を混合したものに、特定の酵素を添加した模擬血清試料である。さらに、脂質コントロール血清セットには、脂質関連物質の定量値が分かっている2種の模擬血清試料が含まれている。これらの試料は、たんぱく質とリポタンパク質及び脂質成分については、ヒト由来のものを含んでいるので、正常なヒトのコントロール試料としても用いることができると考えられる。たんぱく質の分析パターンは正常なヒト血清と同等であり、A/G比の値も再現性よく正常値を示すことから、学生実習でのコントロール試料として使用可能なことが確認できた。

脂質の分析については、セルロースアセテート膜電気泳動での染色条件について検討を行った。脂質を選択的に染色する方法としては、これまでにオゾン処理をしたのちに染色する方法<sup>3)</sup>、Oil Red Oを用いて染色し、バックグラウンドを漂白剤で除去する方法<sup>4)</sup>などが報告されているが、いずれも手間のかかる方法で、時間的制約を伴う学生実習などで行うには不適當であった。今回、Sudan Red 7Bにより、アルカリ条件下で染色することにより、2 $\mu$ Lという少量のヒト血清試料でも、短時間でバックグラウンドの低い良好な染色像を得ることができた。染色される脂質としては、Sudan Red 7Bが主に疎水的な相互作用により脂質と特異的に結合することが考えられるため、中性脂肪、コレステロール及びリン脂質などが染まっていると考えられる<sup>10)</sup>。コントロール血清を用いたSudan Red 7Bによる染色では、主に2本のバンドが染色された。リポタンパク質の電気泳動による分析では、その表面電荷の違いにより、 $\alpha$ -リポタンパク質分画、プレ $\beta$ -リポタンパク質分画、 $\beta$ -リポタンパク質分画の3つに分かれることが報告されている。これまでに報告されているセルロースアセテート膜電気泳動でのヒト血清リポタンパク質の分離パターンとの比較から、泳動の早いバンドがHDLを主に含む $\alpha$ -リポタンパク質分画に相当し、遅くやや濃く染色されるバンドが、LDLを多く含む $\beta$ -リポタンパク質分画に相当すると考えられる<sup>4)</sup>。パターンはやや異なるが、これまでに報告されている、セルロースアセテート膜電気泳動で血清を分離したのちSudan Red 7Bで染色したパターンとも一致した<sup>5)</sup>。一方、血清リポタンパク質をセルロースアセテート膜電気泳動で分離した場合に、

$\beta$ -リポタンパク質分画よりやや泳動度の大きいバンドとして観察されるプレ $\beta$ -リポタンパク質分画は、今回の電気泳動では観察されなかった。プレ $\beta$ -リポタンパク質分画は主にVLDLを含むとされている。今回、この分画に相当するバンドが検出されなかった原因としては、分離が不完全で、 $\beta$ -リポタンパク質分画と分離できなかったことが第一に考えられる。そのほかの要因として、VLDLはLDL、HDLに比較して血清中の量が少なく、比較的量の多い男性でもHDLの1/2程度しか血清に含まれていないこと<sup>11)</sup>、また、主に中性脂肪の運搬に関与しており、その含量も個人差が大きいことから、今回用いた試料中のVLDLの量が少なかった可能性も考えられる。

脂質染色での定量性を確認するため、パーソナルコンピュータに画像を取り込んだのち、バンドの濃さを定量し $\alpha$ -リポタンパク質分画と $\beta$ -リポタンパク質分画の比率を求め、試料として用いた脂質コントロール血清のHDL-コレステロールおよびLDL-コレステロールの測定値から計算されるHDL/LDL比との比較を行った。試料として用いた脂質コントロール血清セットの血清試料1のHDLコレステロール及びLDLコレステロールの測定値は、それぞれ88 mg/dL、42.5 mg/dLであり、脂質コントロールセットの血清試料2については、それぞれ121 mg/dL、59.0 mg/dLであった。この値から、HDL-コレステロール/LDL-コレステロール (HDL-C/LDL-C) の値を計算すると、2.07および2.05となった。HDL-C/LDL-Cの値は、動脈硬化指数とも呼ばれ、最近では突然死との関連も報告されており、臨床検査値としても注目されている<sup>12)</sup>。HDLおよびLDLの脂質の総量に対するコレステロール含量はともに40-60%であるため<sup>11)</sup>、脂質染色により求めたそれぞれの分画の量比もこの値に近くなることが予想される。実際、3回の測定値の平均として得られた $\beta$ -リポタンパク質/ $\alpha$ -リポタンパク質の値(表2の $\beta/\alpha$  ratio)は、脂質コントロール血清1について2.3 (S.D. 0.3)、脂質コントロール血清2については、1.7 (S.D. 0.7) となり、それぞれの試料のコレステロール測定値より計算した値と近い値となった。臨床試料においても、今回計算した $\beta/\alpha$ リポタンパク質分画の比率が、HDL-C/LDL-Cと同等の値を示すかについては、試料として正常値の範囲にあるものしか用いていないため、今回の研究からは判断できないが、血清中のリポタンパク質の意義について学習する教材としては有用であると考えられる。

## 謝 辞

本研究で扱ったニトロセルロース膜電気泳動によるリポタンパク質の分析を学生実験に導入する際の条件検討についてご協力いただいた、本学技術職員の神田恵氏に感謝いたします。

## 要 約

本研究では、セルロースアセテート膜電気泳動による血清リポタンパク質の分析条件について検討した。血清たんぱく質の分析と同様にバルビツールNa緩衝液を用いて電気泳動を行いSudan Red 7Bで染色することにより良好な染色像を得た。バンドの濃さから、HDL、LDLを含む $\alpha$ -および $\beta$ -リポタンパク質分画を定量し、その比率を求めたところ、臨床検査値としても注目されているHDL-コレステロール/LDL-コレステロール値と近い値を得ることができた。

セルロースアセテート膜電気泳動による血清リポタンパク質の分析は、用いる血清試料が $2\mu\text{L}$ と少量で行うことができ、全体の操作も2時間程度で終わることができることから、医療系教育機関での学生実験の項目としても有用であると考えられる。

#### 引用文献

1. 金井正光編：臨床検査法提要 改訂第32版，金原出版，pp.481-486（2005）。
2. 代子芝紀：目で見る電気泳動法 I セルロースアセテート膜，医歯薬出版，pp.1-36（1988）
3. Magnani, H. N., and Howard, A. N.: A quantitative method for blood lipoproteins using cellulose acetate electrophoresis., *Journal of clinical pathology*, **24**, pp.837-845（1971）
4. Beckering, R. E., and Ellefson, R. D.: A rapid method for lipoprotein electrophoresis using cellulose acetate as support medium., *American journal of clinical pathology*, **53**, pp.84-88（1970）
5. Anwar, M., Giotti, S. G., M., and Masoom, M.: Lipoprotein Isolation on Cellulose Acetate Membrane for Cholesterol Estimation from Blood Samples of Cardiac Patients., *Journal of the Chemical Society of Pakistan(JCSP)*, **26**, pp.163-166（2004）
6. Hulley, S. B., Cook, SG, Wilson, W. S., Nichaman, M. Z., Hatch, F. T., Lindgren, F. T.: Quantitation of serum lipoproteins by electrophoresis on agarose gel: standardization in lipoprotein concentration units (mg-100 ml) by comparison with analytical ultracentrifugation., *Journal of Lipid Research*, **12**, pp.420-33（1971）
7. (株)ヘレナ研究所. エンバイザ2製品ページ, [http://www.helena.co.jp/product/lipid/lipo/lipo\\_rinsho.htm](http://www.helena.co.jp/product/lipid/lipo/lipo_rinsho.htm). (2017/9/7)
8. Schneider, Caroline A., Rasband, Wayne S., and Eliceiri, Kevin W/: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis., *Nature methods*, **9**, pp.671-675（2012）
9. Sigma-Aldrich社：Oil Red O, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o9755?lang=ja&region=JP>, (2017/5/30)
10. 蓮沼進, 中野栄二, 桜林郁之介：脂質染色法の問題点, *生物物理化学*, **16**, pp.15-18（1971年）
11. 福田ひとみ：脂質の摂取と遺伝子発現, 金本龍平（編）, *分子栄養学*, pp.69-90（2005）
12. Kunutsor, S. K., Zaccardi, F., Karppi, J., Kurl, S., and Laukkanen, J. A.: Is High Serum LDL/HDL Cholesterol Ratio an Emerging Risk Factor for Sudden Cardiac Death? Findings from the KIHDS Study., *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, advance publication, published online（October 26, 2016）

#### Abstract

Electrophoresis using cellulose acetate membranes as support media is widely used for clinical examination of serum protein. In this study, analytical conditions of serum lipoprotein with cellulose acetate electrophoresis were investigated. Similar to the analysis of serum protein by cellulose acetate electrophoresis, a good separation and stained image was obtained by cellulose acetate electrophoresis using sodium barbital buffer solution and staining with Sudan Red 7B. Based on the measurement of the density of the bands of  $\alpha$ - and  $\beta$ -lipoprotein fractions including HDL and LDL, respectively, the  $\alpha$ - and  $\beta$ -lipoprotein fraction ratio ( $\alpha/\beta$  ratio) was calculated. This value was found to be close to the HDL-cholesterol / LDL-cholesterol value, which is attracting attention as a clinical test value related to a risk factor for sudden cardiac death. Because analysis of serum lipoprotein by cellulose acetate electrophoresis established in the report can be performed with as little as  $2\mu\text{L}$  of human serum sample and the whole procedure can be completed within 2 hours, it is considered to be a valuable program for an experimental course in medical education.

