
高速液体クロマトグラフィーを用いる高脂血症血液の分析とその経過の追跡

Screening of hyperlipedemic sera by high performance liquid chromatographic method

- | | | |
|-------|--|---------|
| 代表研究者 | 東京医科歯科大学教養部教授
Prof., Dep. of General Education. Tokyo Medical and Dental Univ.
Ichiro HARA | 原 一 郎* |
| 協同研究者 | 東京医科歯科大学医学部教授
Prof., Faculty of Medicine. Tokyo Medical and Dental Univ.
Shizuo HANDA | 飯 田 静 夫 |
| | 東京医科歯科大学医学部助教授
Assoc., Prof. Faculty of Medicine. Tokyo Medical and Dental Univ.
Junro HOSAKI | 保 崎 純 朗 |
| | 東京医科歯科大学教養部講師
Lecturer, Dept. of General Education. Tokyo Medical and Dental Univ.
Mitsuyo OKAZAKI | 岡 崎 三 代 |
| | 東京逓信病院内科部長
Director, Department of Internal Med. Tokyo Teishin Hospital
Kaneyuki NAITO | 内 藤 周 幸 |

Analysis of the lipid components in human serum lipoprotein gives the most important data to treat and to protect the atherosclerotic diseases, especially, coronary heart attack.

Recently, we have already developed to determine cholesterol in each lipoprotein fraction by high performance liquid chromatography (HPLC).

In the first year of the research, we tried to estimate the choline-containing phospholipids (phosphatidyl choline and sphingomyelin) and triglycerides. The procedures for the determination of two components were similar to that of cholesterol, and the enzymatic reagents were available in the market. The reaction times were 4 min. for phospholipid and 20 min. for triglycerides.

The natures of the patterns obtained by phospholipids and triglycerides determination were in some extent different from that of cholesterol. And the comparison of these patterns may gave the important informations for the atherosclerotic diseases.

Fredrickson *et al.* (1967) proposed the classification of familial hyperlipoproteinemic sera into 6 groups by electrophoretic observation as follows: I, II_a, II_b, III, IV and V, respectively. Each serum of these diseases shows its characteristic lipid content and also special figure on electrophoresis.

We applied HPLC for the classification of familial hyperlipoproteinemic sera and obtained characteristic patterns of CH, Pl and TG.

We also examined the relation between the analytical data of cholesterol and phospholipid in the lipoprotein fraction by HPLC and by ultracentrifugal method. These two data agreed fairly each other.

These results will promise in nearer future the general utilization of HPLC for the quantitation of serum lipoprotein.

* 現在東洋曹達工業 (株) 科学計測開発部

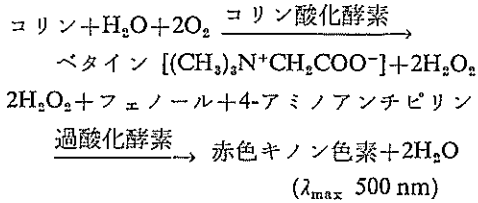
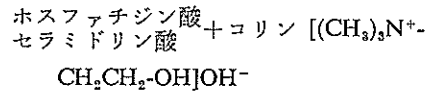
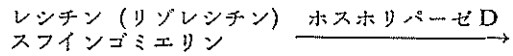
研究目的

高脂血症，虚血性心臓障害（心筋硬塞など），あるいは肥満などのいわゆる脂質代謝異常などにおいて，血清中の脂質の分析定量は，治療経過を追跡するため最も重要な指標である。一方，血清中の脂質はすべて数種のリポタンパク質の形で存在し，代謝されている。このリポタンパク質を迅速に，しかも簡単に分析すれば，上記の目的を完全に達成できるわけである。原らは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い，コレステロールを定量することによって，リポタンパク質各成分の定量法を確立した^{1)~7)}。本研究の目的は，コレステロール以外の成分であるリン脂質，トリグリセリドの分析法を研究し，リポタンパク質の全脂質分析法を確立することである。

研究経過と結果

血清中の全脂質（コレステロール：CH，トリグリセリド：TG，およびリン脂質：PL）はタンパク質と結合して複合体を作り，初めて水に溶けるようになる。リポタンパク質は脂質が水に溶けるための形とすることができる。

昭和 56 年までに我々の研究室においては，未処理血清 5~20 μ l を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）装置（HLC 803D 東洋ソーダ）に負荷し，カラムの溶出液にコレステロール測定用の臨床検査酵素試薬を加えることによって CH を測定し，リポタンパク質の分析パターンを得ることができたが⁸⁾，その後 56~57 年にかけて，他の脂質成分，PL および TC を測定して，それぞれの分析パターンを得ることができた。まず PL の酵素反応のスキームは次のとおりである⁹⁾。



PL はリポタンパク質中に広くそしてかたより

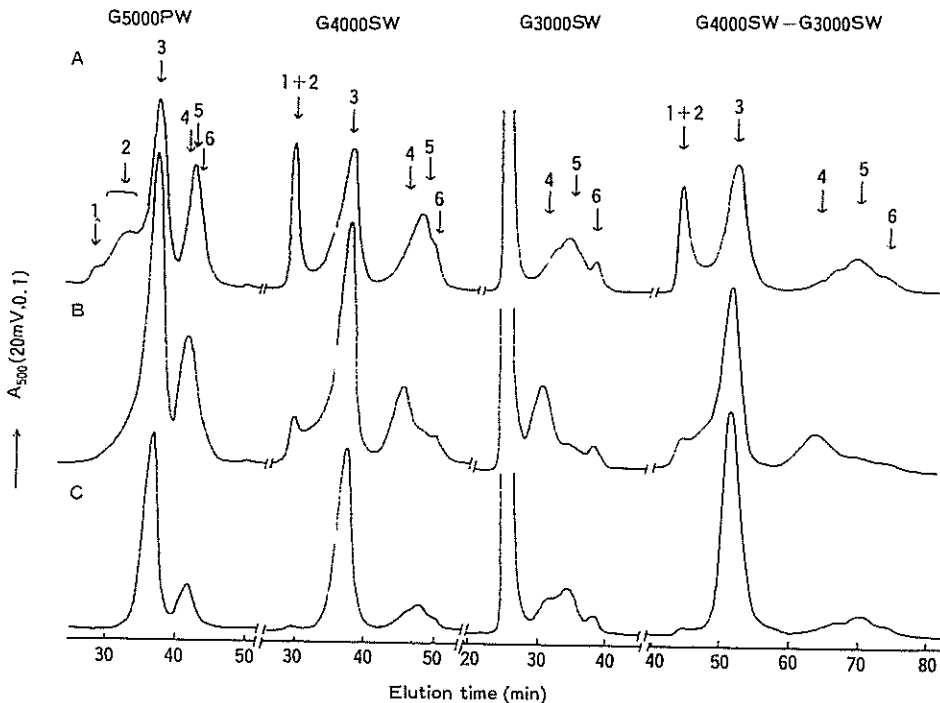


図 1. カラムの組合せと分離能（リン脂質モニター）

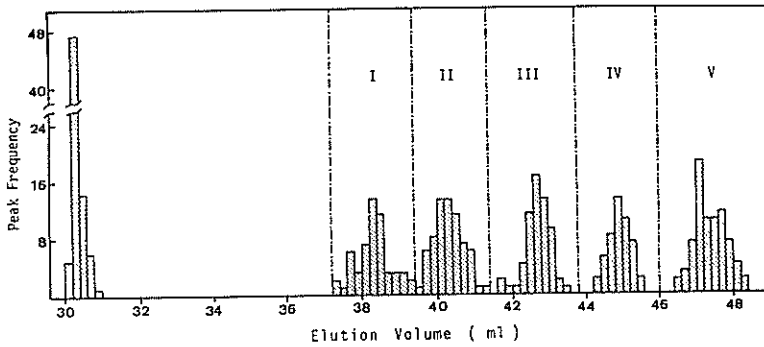


図 2. HDL の Subfractions (HPLC 法による)

なく存在しているので、いろいろの血清を比較するの都合が良い。各種のカラム系を用いてカラム系の分離能の是非を調べた結果、図 1 のような結果となり、これにより高脂血症系には G 5000 PW を主とした組み合わせ、また HDL を詳しく見るためには G 3000 SW の組み合わせ、さらに一般的な使用には G 4000 SW + G 3000 SW が良いということになった*。

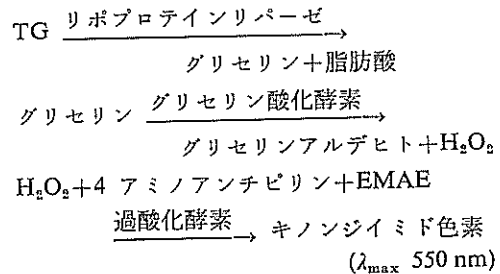
なお A, B, C の各血清は高脂血症血清で、その分析値は A: TC-224 mg/dl, TG-262 mg/dl, PL-240 mg/dl, B: 314 mg/dl, 221 mg/dl, 259 mg/dl, C: 358 mg/dl, 88 mg/dl, 279 mg/dl であった。なお図 1 中の 1+2 は chylomicron, 3 は LDL, 4 は HDL₂, 5 は HDL₃, 6 は VHDL である。

なお、この HDL 分画はやはりいろいろの HDL 系の混合物であって、これをいくつかの分画に超遠心分離によって分けることがいろいろと行なわれており、HDL_{2a} (d 1.063~1.100), HDL_{2b} (d 1.100~1.125) および HDL_{3L} (1.140), HDL_{3D} (1.160) というように分画された。

HPLC を用い、TSKGEL G 3000 SW を 3 本シリーズに連結し、HDL 分画をこまかく分画した結果、大体上記の超遠心の分画に準じた 5 分画を得る事が出来た。健常人血清 71 例につき各ピークの溶出容量 (ml) とその出現頻度 (frequency) を見ると図 2 の関係にあずかり、I~V の分画になり、その分子粒子直径 122.0 ± 2.8 , 110.1 ± 2.1 , 97.5 ± 1.8 , 86.7 ± 1.3 および $76.3 \pm 1.6 \text{ \AA}$ となった。

* TSK (TEL) PW 系と SW 系(東洋ソーダ工業(株))

次に TG についても同じように臨床検査用酵素試薬キットが発売されており、その多酵素反応のスキームは次に示す。



∴ EMAE: N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N-アセチルエチレンジアミン

この TG でモニターする方法は TG 含量の高い血清の TG 含量の多いリポタンパク質分画を調べるために非常に良い手法で図 3 にコレステロール分析パターンとの比較を示す。

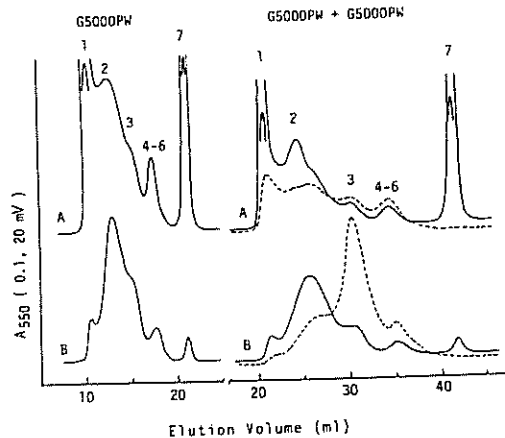


図 3. TG と CH のパターンとの比較 (A, B ともに高脂血症血清)。

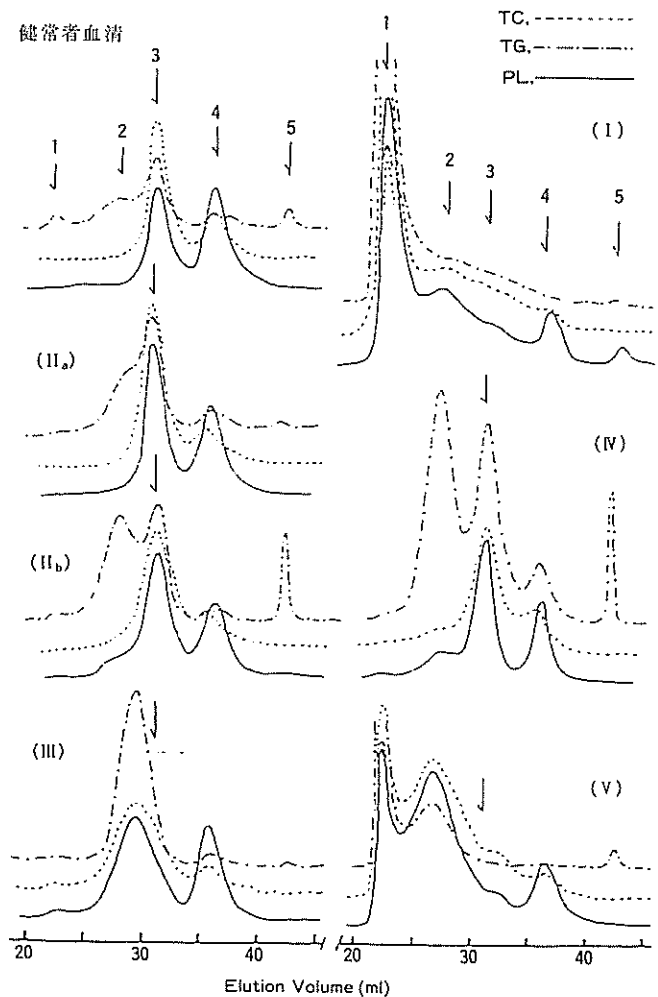


図 4. 家族性高脂血症のパターン 1: chylomicron, 2: VLDL, 3: LDL, 4: HDL, 5: カラム限界

これら CH, TG および PL によるモニター系の完成によりヒトの家族性高脂血症 (familial hyperlipoproteinemia) の血清を分画した。この遺伝的疾患については、その血清の電気泳動パターンによって Fredrickson らが 1967 年に 5~6 型に分け、これが現在でも広く利用されている⁹⁾。この 6 型を HPLC のパターンにしたものが図 4 であって将来はこのパターンが臨床に広く応用されることを期待している。

以上、HPLC による血清リポタンパク質の分析の方法は確立されたが、この HPLC による分析と在来の超遠心分離法による分析との相関が問題にあずかってくるので、その比較を行なったところ、

健常者血清などでは良い一致が見られる^{9,10)}。その方法は図 5 のように HPLC によるパターンを溶出容量と粒子直径との関係から分画し、 >30.0

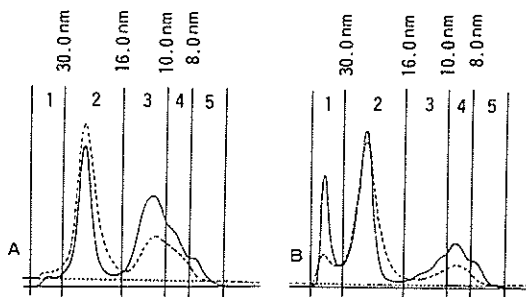


図 5. 健常者血清 (A) と高脂血症血清 (B) 液の分画のとり方

表 1. HPLC 法 (x) と 超遠心法 (y) の分析値の比較 健常者 15 例 高脂血症 12 例

Group	Lipoprotein fraction (class)		Mean±SD, g/l		y=ax+b		
			HPLC (x)	UC (y)	a	b	r
Normolipidemia	Fraction 1 (C+VLDL)	TC	0.046±0.032	0.079±0.061	1.778	-0.003	0.939
		PL	0.053±0.050	0.082±0.076	1.387	0.009	0.912
	Fraction 2 (LDL)	TC	1.298±0.312	1.296±0.314	0.983	0.021	0.978
		PL	0.875±0.234	0.850±0.222	0.920	0.045	0.967
	Fraction 3 (HDL ₂)	TC	0.331±0.129	0.344±0.148	1.103	-0.022	0.958
		PL	0.424±0.141	0.429±0.171	1.165	-0.065	0.962
	Fraction 4 (HDL ₃)	TC	0.216±0.043	0.198±0.059	1.143	-0.049	0.835
		PL	0.348±0.076	0.309±0.087	0.991	-0.036	0.868
	Fraction 5 (VHDL)	PL	0.114±0.025	0.167±0.041	0.592	0.099	0.368
	Hyperlipidemia	Fraction 1 (C+VLDL)	TC	0.251±0.283	0.332±0.323	1.120	0.050
PL			0.304±0.331	0.336±0.346	1.029	0.023	0.985
Fraction 2 (LDL)		TC	2.094±1.018	2.056±1.055	1.033	-0.106	0.997
		PL	1.298±0.668	1.278±0.672	0.998	-0.019	0.992
Fraction 3 (HDL ₂)		TC	0.302±0.170	0.312±0.180	1.041	-0.003	0.981
		PL	0.435±0.263	0.427±0.242	0.912	0.031	0.991
Fraction 4 (HDL ₃)		TC	0.208±0.070	0.180±0.073	0.916	-0.010	0.878
		PL	0.351±0.130	0.297±0.130	0.964	-0.041	0.966
Fraction 5 (VHDL)		PL	0.132±0.027	0.183±0.043	0.438	0.126	0.248

nm のものを chylomicron+VLDL, 30.0~16.0 nm を LDL, 16.0~10.0 nm を HDL₂, 10.0~8.0 nm を HDL₃, 8.0 nm > を VHDL とした。これら各分画の PL, CH 値を比較したのが表 1 で相関係数は高い値となり, この両方法がともに正しい値を出していることが分かる。今後リポタンパク質の研究はそのタンパク質部分 (アポタンパク質) に移りつつあるが, 今後同じように HPLC によるアポタンパク質分析がやはり重要な分析法として臨床的にも用いられるであろう。

これらの研究に対し有効な援助をあたえられた日産科学振興財団に深く感謝するものである。

参考文献

- 1) Hara, I., M. Okazaki and Y. Ohno: Rapid analysis of HDL and LDL in human serum by HPLC., *J. Biochem.*, **87**, 1867 (1980).
- 2) Okazaki, M., Y. Ohno and I. Hara: HPLC gel permeation chromatography of human serum lipoproteins. *J. Chromato.*, **221**, 257 (1980).
- 3) Okazaki, M., Y. Shiraishi, Y. Ohno, and I. Hara: HPLC gel permeation chromatography of serum lipoproteins. Selective detection of cholesterol by enzymatic reaction. *J. Chromato.*, **223**, 285 (1981).
- 4) Okazaki, M., Y. Ohno and I. Hara: Rapis method for the quantitation of cholesterol in human serum lipoproteins by HPLC. *J. Biochem.*, **89**, 879 (1981).
- 5) Ohno, Y., M. Okazaki and I. Hara: Fractionation of human serum lipoproteins by HPLC. *J. Biochem.*, **89**, 1675 (1981).
- 6) Hara, I., K. Shiraishi, and M. Okazaki: HPLC of serum lipoproteins, Selective detection of triglycerides by enzymatic reaction. *J. Chromato.*, **239**, 549 (1982).
- 7) Okazaki, M., N. Hagiwara and I. Hara: Quantitation method for choline-containing phospholipids in human serum lipoproteins by HPLC. *J. Biochem.*, **91**, 1381 (1982).
- 8) Fredrickson, D. S., R. T. Revy and R. S. Lees: Fat transport in lipoproteins, An iterated approach to mechanisms and disorders, *New Eng. J. Med.*, **276**, 33, 94, 148, 214, 273 (1967).
- 9) Okazaki, M., H. Itakura, K. Shiraishi, and I. Hara: Serum lipoprotein measurement Liquid chromatography and sequential floatation compared. *Clin. Chem.*, **29**, 350 (1983).
- 10) Okazaki, M., A. Takizawa, and I. Hara: Serum lipoprotein. High performance liquid chromatography and agarose gel electrophoresis compared. *YAKUGAKU*, (in press).