

スラブ式ポリアクリルアミド電気泳動法による LpX の検出 —— 血清を試料とする先天性胆道閉鎖症の ハイリスク・スクリーニング ——

三上 篤 富士 勝 清水 良夫 菊地由生子

要 旨

先天性胆道閉鎖症 (CBA) の確定診断法として、胆汁うっ滞時に血中に特異的に出現する異常リポ蛋白 (LpX) を検出するスラブ式ポリアクリルアミド電気泳動法を開発した。

本法を用いることにより、リポ蛋白分画 (VLDL, IDL, LDL, HDL) 像が明瞭となり、同じ IDL 画分である動脈硬化性リポ蛋白 Lp(a) との分離も良好となった。

また、新生児先天性代謝異常症等のマス・スクリーニングと平行して、本症のマス・スクリーニングを行う目的で、本法により乾燥濾紙血液中のリポ蛋白分画を試みたが、リポ蛋白像は乱れ、分画が不可能であることが判明した。

1. 緒 言

先天性胆道閉鎖症¹⁾ (CBA (Congenital biliary atresia) は、胆汁を肝臓から十二指腸へ送る胆道 (肝外胆管) が生まれつき狭いか、閉塞している病気である。発症率は約 1 万人に 1 人と高頻度であり、手術を行わずに放置された場合、肝硬変による慢性肝不全が食道静脈瘤破裂による大量出血で、2 歳半頃までに死亡してしまう。しかし、早期に発見し生後 2 カ月以内に手術を行えば^{2),3)}、約 8 割の患児を救命し得るとされている。症状は生後一週間以降持続する黄疸と灰白色便が特徴であるが、新生児特有の生理的黄疸や新生児肝炎あるいは母乳性黄疸と区別がつかず、全国で 1 年に発生する約 150 人の患児のうち何割かが適正な治療を受けられず、不幸な転帰をとっているのが現状である。

現在、本症の確定診断⁴⁾には十二指腸ゾンデ、超音波検査そして寒天ゲル電気泳動法; BAGE (Bact-agar gel electrophoresis) による LpX の検出^{5),6),7),8),9)}が有効な方法として知られている。LpX の検出法には、超遠心分離法¹⁰⁾、HPLC 法¹¹⁾、沈殿分画法^{8),9),12)}、BAGE が知られており、簡易検査としては BAGE が最も普及しているが、いずれの方法も、肝炎では出現せず CBA でのみ出現する特異的リポ蛋白 LpX の検出により、本症の確定診断の一助としている。また、高コレステロール血症診断用ではあるが、リポ蛋白の分離が良好

なキット (リポフォー¹³⁾) : 常光、ディスクポリアクリルアミド電気泳動キット) でも LpX の確認が可能である。しかし、BAGE では検体によって LpX バンドと同じ位置に不明バンドが現われるため、判断に窮するという問題があり、リポフォーでは、LpX バンドと Lp(a)¹⁴⁾ バンドがほとんど同じ位置に泳動されることにより、同定不能である。

そこで、今回我々は、双方の問題を解消したスラブ式ポリアクリルアミド電気泳動法の開発を行い、先天性胆道閉鎖症のハイリスク・スクリーニングの可能性について検討し良好な結果を得たので報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

新生児 CBA 患児血清 1 件、新生児肝機能障害児血清 1 件、Wilson 病患者血清 5 件、コントロール血清; リピッド S (セロテック社)、オーソリキッド・ノーマルおよびアブノーマル (Ortho 社)、Lp(a) STD 血清 (ヘギスト社)、新生児乾燥濾紙血液 (正常児 1 件、CBA 患児 1 件)、妊婦乾燥濾紙血液 1 件

2-2 試 薬

ゲル作製用試薬: ポリアクリルアミド (等電点電気泳動用)、TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) は半井化学、PDA (Piperazine Diacrylamide)、過硫酸アンモニウムは BIO-RAD, リ

ポフラビンは和光純薬の製品を用いた。

バッファー調製用試薬 Tris(生化学用), グリシン, 塩酸は和光純薬の製品を用いた。

脂質染色用試薬 Sudan Black B, ポリエチレングリコールは和光純薬の製品を用いた。

2-3 装置

二連スラブ式電気泳動装置: BE-220 (BIO CRAFT 社) この装置を用いることにより, 同時に 24 サンプルの泳動が可能である。

パワーサプライ: REAL POWER BP-550 (BIO CRAFT 社)

2-4 サンプルの調製

プロピレングリコール 100 ml を 100°C に加熱後, 1 g の Sudan Black B を加えて 5 分間攪拌し, 熱いうちに No. 2 濾紙で吸引濾過して得られた濾液を 0.5% Sudan Black B 溶液とする。血清 3 容に対して 0.5% Sudan Black B 液 1 容を混合し, 室温にて 1 時間静置後, 4°C により 1 日以内に使用する¹⁴⁾。

乾燥濾紙血液の場合, 3 mm ディスク 3 枚から泳動バッファー 40 μ l で 20 分間ミキシングして得られた溶出液 25 μ l と 0.5% Sudan Black B 溶液 2 μ l を混合し, 室温で 1 時間静置後, 4°C により 1 日以内に使用する。

2-5 ゲル調製用保存試薬および泳動バッファーの調製

A 液: 0.48 N-HCl, 0.96 M-Tris, 0.4% TEMED

B 液: 20% アクリルアミド, 0.534% PDA (T=20 53%, C=2.6%)

C 液: 10% アクリルアミド, 2.5% PDA (T=12.5%, C=20%)

D 液: 0.14% 過硫酸アンモニウム

E 液: 0.004% リポフラビン

泳動バッファー: 0.025 M Tris-0.192 M グリシン

これらの試薬は 4°C 冷蔵により 2 週間安定である。

2-6 泳動ゲルの作製

A 液, B 液, C 液の脱気を行い, 分離ゲル用溶液は A 液 1 ml, B 液 1.36 ml, 蒸留水 1.64 ml, D 液 4 ml の混液を, 濃縮ゲル用溶液は A 液 500 μ l, C 液 1 ml, 蒸留水 2 ml, E 液 500 μ l の混液をそれぞれ調製し, ディスク泳動ゲルの作製法¹⁴⁾に倣い, スラブ型泳動ゲルを作製する。

2-7 泳動と保存

スラブ式電気泳動装置の上槽に, 2-5 で作製した泳動ゲルを装着し, 4°C の泳動バッファー約 180 ml (サンプルウェルが液に完全に浸るように)を上槽部に入れる。続いて 4°C の泳動バッファー約 350 ml を下槽部に入れ, その中に上槽部を装着する。

泳動プレートのサンプルコームを静かに引き抜き, サンプルウェル内の残液とゴミを上槽部の泳動バッファーでよく洗い流し, 2-3 で調製したサンプル 5 μ l をサンプルウェル内に注入する。

180 V 定電圧 (24 サンプルで約 60 mA) で 25 分間泳動を行う。泳動後, 泳動プレートを上槽部から取り外し, 水中でスパーテルを用いて注意深くゲルを剥がして, 濾紙 (PKU 濾紙血用原紙が厚さ, 大きさともに使用しやすい) に載せ, 水中から取り出す。紙タオルにゲル面が上になるように濾紙を載せ, 乾燥後に濾紙が平らになるように重しを載せ (ゲル面には載せない), 一昼夜乾燥する。乾燥したら必要な大きさに切り, ELISA 用のプレートシールで挟み保存ゲルとする。

3. 結果

3-1 泳動ゲルの検討

(1) pH の検討

通常, リポ蛋白の分画には, 濃縮ゲルの pH を 7.6 に, 分離ゲルの pH を 8.9 とする不連続バッファー系が用いられている^{15), 16)}。しかし, この方法では図 1 に示すように, HDL バンドが広く拡散してしまい, サンプルによっては, LDL バンドも拡散を起こす。そこで,

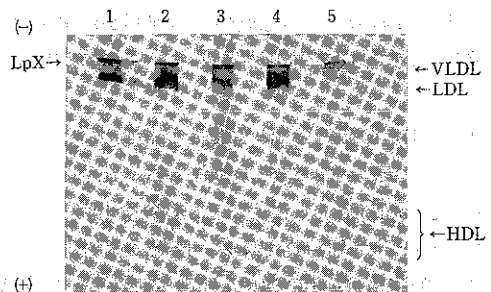


図 1 不連続バッファー系によるリポ蛋白 PAGE 泳動像

条件 T=3.7%, C=2.6% (BIS), pH=7.6 (濃縮ゲル), 8.9 (分離ゲル)

サンプル 1: CBA 患児血清, 2: 新生児肝炎血清, 3: オーソリキッド・アブノーマル, 4: リピッド S, 5: 新生児 DBS 溶出液

バッファー系を濃縮ゲルと分離ゲルの pH が等しい連続系とし、Tris 濃度を 0.06-0.24 M (pH7.6-8.9) の間で検討した。その結果、図 2 に示すように、① HDL バンドが拡散しない② LDL バンドが乱れない③ LpX バンドの出現する VLDL バンドと LDL バンド間の間隔が広い④ HDL バンドが変色しない、4 つの条件を満たす Tris 濃度 0.12 M (pH8.4) がリポ蛋白分画と LpX 検出に適していた。

(2) 濃度の検討

通常、リポ蛋白の分画には、目的に応じて分離ゲルの濃度を T=3-5% の間で選択している。今回は、すべてのリポ蛋白を展開可能な、T=3.2-3.7% の間で検討を行った。その結果、図 3 に示すように、①ゲルが均一で再現性良く② LpX バンドが出現する VLDL バンドと LDL バンド間に広い間隔が得られる T=3.5% が最も適していた。

(3) 架橋剤の検討

一般的に、ポリアクリルアミドゲルの架橋剤には、BIS (N, N'-Methylene-bis (acrylamide)) が用いられているが、最近、同じ濃度で均一かつ固いゲルが作製可能な架橋剤 PDA が開発されたので、比較検討を行った。その結果、図 4 に示すように、①ゲルが均一

で再現性良く② LpX バンドの出現する VLDL バンドと LDL バンド間に広い間隔が得られるゲルの作製が可能となったことより、PDA を架橋剤として用いることとした。

また、ゲルの固さ (架橋度 C%) の検討も併せて行ったところ、LpX バンドの出現する VLDL バンドと LDL バンド間の間隔が最も広い C=2.6% が適当であった。

(1)~(3) の条件検討の結果、T=3.5%、C=2.6% (PDA)、0.12 M-Tris、0.06N-HCl (pH8.4) の泳動ゲルが最も適していた。この条件で泳動を行うことにより、図 5 に示すように、各リポ蛋白がシャープに分画され、LpX バンドの泳動位置と Lp (a) バンドの泳動位置が明らかに異なり、Lp (a) と混同することなく LpX を検出することが可能となった。

3-2 乾燥濾紙血液中心リポ蛋白分画の検討

乾燥濾紙血液中心リポ蛋白の分画が可能であれば、新生児先天性代謝異常症等のマス・スクリーニングと平行して本症のマス・スクリーニングも可能であると期待し、同様の方法で分画を試みた。その結果、図 6 に示すように、VLDL バンドのみがシャープに現れたが、リポ蛋白像は乱れ、目的とする LpX バンドの検出

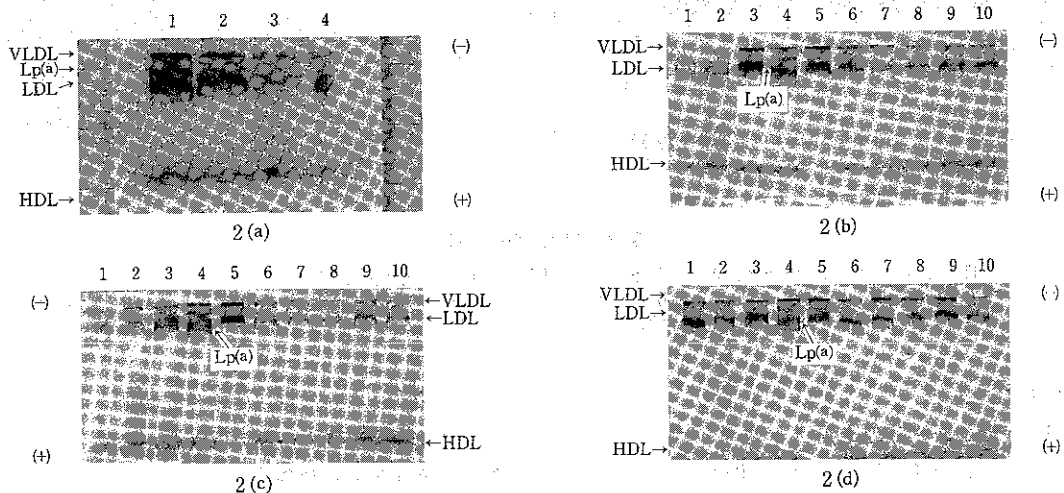


図 2 pH の検討 (連続バッファー系)

条 件 T=3.7%, C=2.6% (BIS), 2(a): Tris 0.06M (pH7.6), 2(b): Tris 0.12M (pH8.4), 2(c): Tris 0.18M (pH8.8), 2(d): Tris 0.24M (pH8.9)
 サンプル 2(a)-1: Lp (a) 血清, 2: オーソリキッド・ノーマル, 3: オーソリキッド・アブノーマル, 4: リピッド S
 2(b)~2(d)-1: リピッド S, 2: オーソリキッド・アブノーマル, 3: オーソリキッド・ノーマル, 4: Lp (a) 血清, 5: CBA 患児血清, 6: Wilson 病患者血清 1, 7: Wilson 病患者血清 2, 8: Wilson 病患者血清 3, 9: Wilson 病患者血清 4, 10: Wilson 病患者血清 5

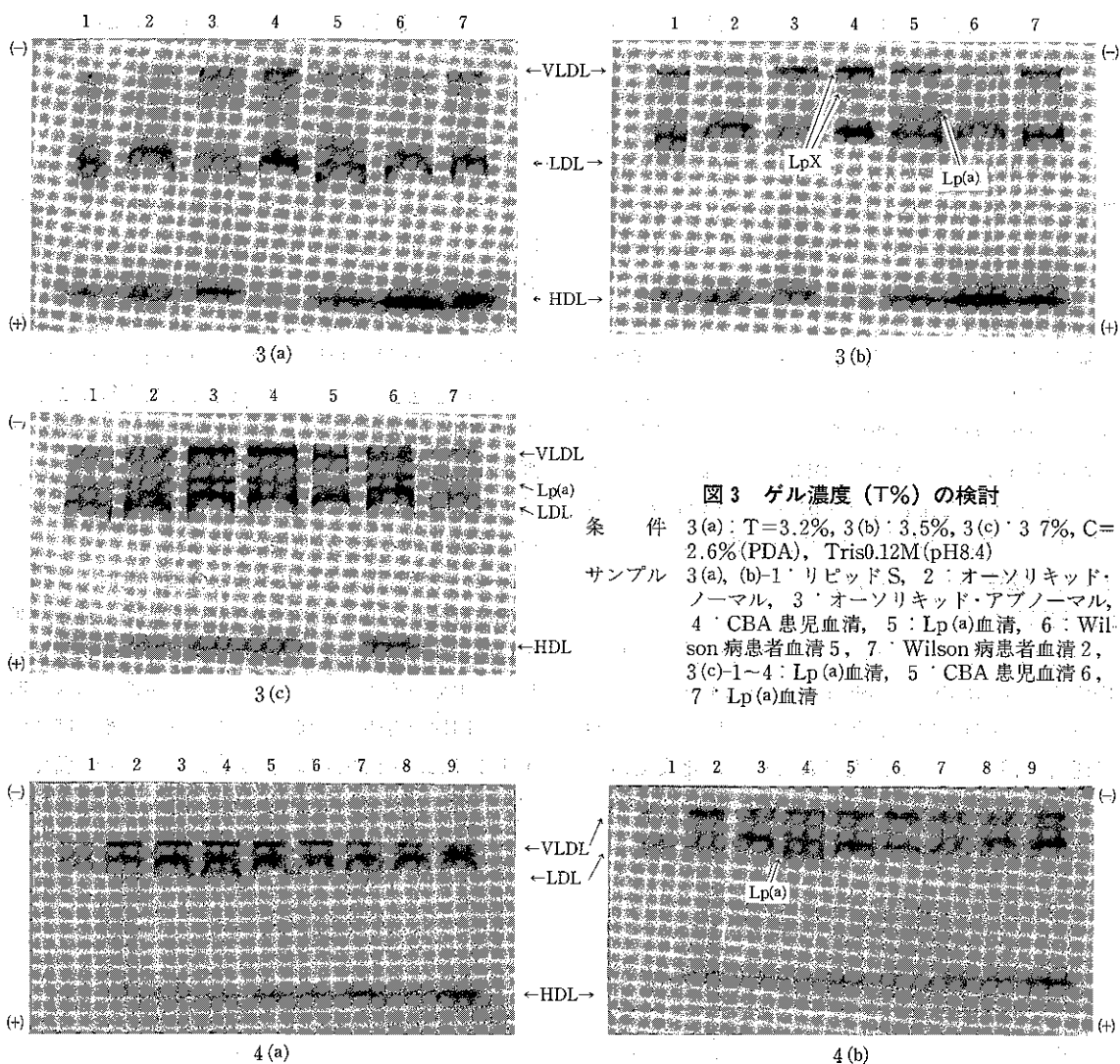


図3 ゲル濃度 (T%) の検計

条 件 3(a): T=3.2%, 3(b): 3.5%, 3(c): 3.7%, C=2.6% (PDA), Tris0.12M (pH8.4)
 サンプル 3(a), (b)-1: リピッドS, 2: オーソリキッド・ノーマル, 3: オーソリキッド・アブノーマル, 4: CBA 患児血清, 5: Lp(a)血清, 6: Wilson 病患者血清, 7: Wilson 病患者血清, 3(c)-1~4: Lp(a)血清, 5: CBA 患児血清, 6, 7: Lp(a)血清

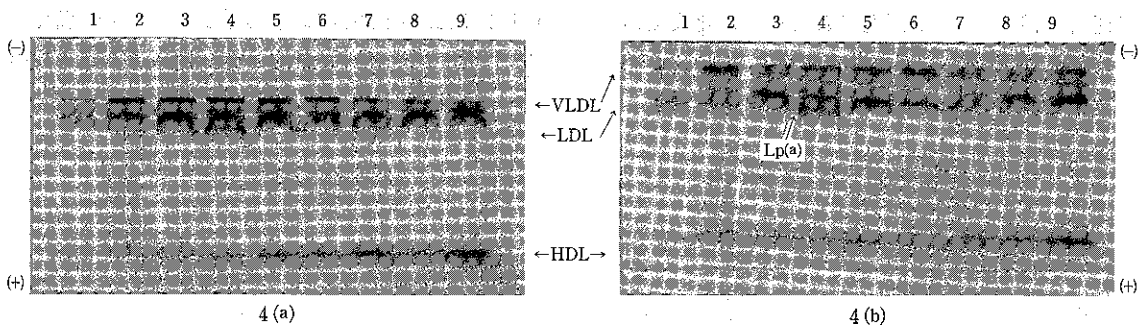


図4 架橋剤の検計

条 件 T=3.7%, C=2.6%, 4(a): BIS, 4(b): PDA, Tris0.12M (pH8.4)
 サンプル 1: リピッドS, 2: オーソリキッド・アブノーマル, 3: オーソリキッド・ノーマル, 4: Lp(a)血清, 5: Wilson 病患者血清, 6: 同2, 7: 同3, 8: 同4, 9: 同5

は不可能であった。

3-3 リポフォーとの比較

リポ蛋白分画と LpX バンドの検出について、本法とリポフォーとの比較を行った。その結果、図7に示すように、リポフォーでは LpX バンドと Lp(a) バンドの泳動位置がほとんど同じであり、LpX の同定は不可能であった。

また、リポフォーは泳動後、ゲルの保存が不可能であり、デンシトメトリーか写真撮影により泳動像を保

存する必要があるが、本法によれば泳動ゲルを乾燥によりそのまま保存できるという利点がある。

3-4 BAGE との比較

リポ蛋白分画と LpX バンドの検出について、本法と BAGE との比較を行った。BAGE の利点は、図8に示すように、LpX バンドのみが陰極側に泳動されるため、他のリポ蛋白との識別が容易なことである^{5),9)}。しかし、他のリポ蛋白の分画が不可能なため、リポ蛋白の観察による病態の解析ができない。一方、本法によ

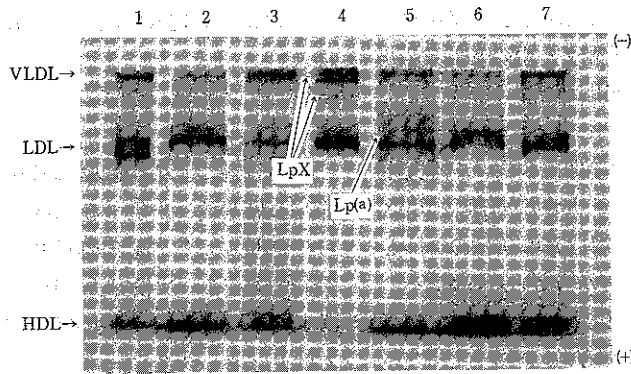


図5 スラブ式 PAGE リポ蛋白分画泳動像

条件 T=3.5%, C=2.6%(PDA), Tris0.12M(pH8.4)

サンプル 1:リピッドS, 2:オーソリキッド・ノーマル, 3:オーソリキッド・アブノーマル, 4:CBA 患児血清, 5:Lp(a)血清, 6:Wilson病患者血清1, 7:同2

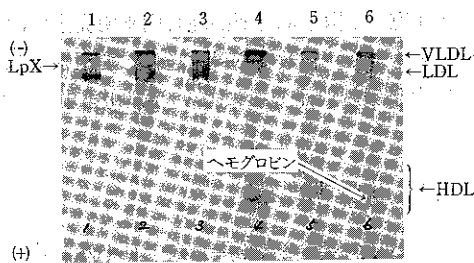


図6 乾燥濾紙血液中リポ蛋白 PAGE 泳動像

条件 T=3.7%, C=2.6%(BIS), pH=7.6(濃縮ゲル), 8.9(分離ゲル)

サンプル 1:CBA患児血清, 2:オーソリキッド・アブノーマル, 3:リピッドS, 4:妊婦DBS溶出液, 5:新生児DBS溶出液, 6:CBA患児DBS溶出液

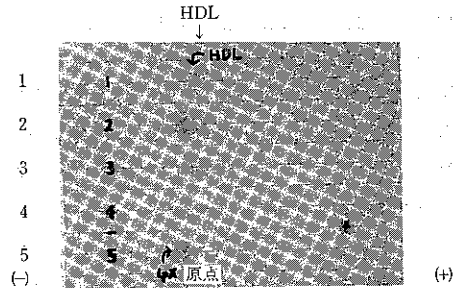


図8 リポ蛋白 BAGE 泳動像

条件 チバコーニンググリコヘモグロビン用寒天ゲルフィルム使用, 90V定電圧, 50分

サンプル 1:リピッドS, 2:オーソリキッド・アブノーマル(HDL), 3:オーソリキッド・ノーマル(HDL), 4:Lp(a)血清(HDL), 5:CBA患児血清(LpX+HDL)

※各サンプルとも抗β-リポ蛋白(カイロミクロン, VLDL, LDL)血清処理後の上清である。

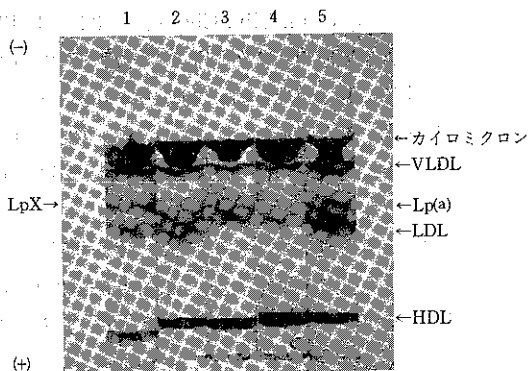


図7 リポフォーによるリポ蛋白泳動像

サンプル 1:CBA患児血清, 2:リピッドS, 3:オーソリキッド・ノーマル, 4:オーソリキッド・アブノーマル, 5:Lp(a)血清

れば, リポ蛋白分画と LpX バンドの検出が同時に可能であった。

4. 考 察

今回, スラブ式ポリアクリルアミド電気泳動法による LpX 検出法を開発する際に鍵となったのは, 濃縮ゲルと分離ゲルのバッファーを不連続バッファー系から連続バッファー系に改めた点である。

Lp(a)の検出には, 一般的に不連続バッファー系による蛋白質分離法の原理(Ornstein-Davis法¹⁰⁾)を応用した手法を用いている。ところが, この方法によると, VLDL, LDL バンドはシャープになるものの, その間隔は狭まり, HDL が拡散を起こす¹⁴⁾。そこで, 分

離ゲル中と濃縮ゲル中の Tris 濃度が等しい連続バッファ系とすることにより、分離ゲル中の pH とグリシネートイオンの移動速度を変化させないようにした結果、HDL の拡散が解消され、LpX の出現する VLDL バンドと LDL バンド間の間隔が広い、本文中の図 5 のような泳動像が得られ、リポ蛋白分画と LpX の検出が同時に可能となった。尚、HDL 拡散の原因となる要素は、pH やイオン強度等が考えられるが、その関係解明については今後の課題である。

LpX には 3 つの亜分画の存在が知られている^{17),18)}。本測定法においても、CBA 患児血清で VLDL と LDL 間の IDL (中密度リポ蛋白) として LpX バンドが 2 本検出されたが、血清量に限りがあり各分画の同定は行っていない。1 本のバンドは比較的検出しやすい位置に泳動されるが、もう 1 本は VLDL バンドに非常に近い位置に泳動される (図 5) ため、その濃度が低い場合には検出不可能となる。今後、CBA 患児血清を多数入手できれば、上記の点に注目して、各 LpX の定量検討により各患児血清の LpX 動態がより明らかになると思われる。

CBA 患児血清中に LpX が検出されることは Seidel らの報告^{9),10)} により明らかである。この報告によると、LpX の検出により、CBA と同様に黄疸の出現する肝疾患と本症とを鑑別し、診断できる確率は約 90% である⁹⁾。また、新生児期においても、CBA では LpX は陽性であるとの報告^{19),20)} があり、LpX を指標とした CBA の新生児スクリーニングは有効と思われる。しかし、乾燥濾紙血液では LpX 検出が不可能で、しかも生後 5 日目新生児すべての血清の入手も現行のマス・スクリーニングシステムでは困難である。そこで、CBA の早期発見のためのスクリーニングシステムとして、一カ月健診時の便の色調検査あるいは、問診によるチェックリストスコア方式の両者による一次スクリーニングに引き続き、本法による二次スクリーニング及び精密検査を行うのがよいと考えられる。しかし、この方式では一次スクリーニングが生後一カ月以降となるため、予後を左右する二カ月以内での施術には時間的にかなりの制約がある。したがって、今後一次スクリーニングとして、現行の新生児マス・スクリーニング用の乾燥濾紙血液による、新たな指標を用いた検査法の開発が望まれる。

いずれにしても、本法は CBA の二次スクリーニン

グ法および確定診断法として有用であると考えられる。

5. 結 語

血清試料により、先天性胆道閉鎖症 (CBA) 患者血清中に特異的に出現する LpX の検出が、スラブ式ポリアクリルアミド電気泳動法において可能となった。今後、本症の一次検査法が確立すれば、寒天ゲル電気泳動法 (BAGE) と本法の併用より、より信頼できるハイリスク・スクリーニングシステムの確立が期待される。

謝 辞

本法の開発にあたり、患児血清を御供与いただきました北海道大学医学部附属病院日向平明先生に深謝いたします。また、多数の資料を送付して頂きました自治医科大学塚越典子先生に心から御礼を申し上げます。

6. 文 献

- 1) 日本小児外科学会学術委員会・日小外会誌, 5, 843-844, 1989.
- 2) 大井龍司, 他・日小外会誌, 10, 25, 1974.
- 3) 葛西森夫, 他・日小外会誌, 21, 1133-1144, 1985.
- 4) 田澤雄作・小児内科, 12, 1680-1682, 1980.
- 5) Seidel, D., et al. J. Clin. Invest., 48, 1211-1223, 1969
- 6) Seidel, D., et al. Clin. Chem., 19, 86-91, 1973
- 7) 田澤雄作, 他・小児外科, 13, 775-779, 1981.
- 8) 中西守, 他・臨床病理, 30, 97-102, 1982.
- 9) 津島満, 他・臨床検査, 29, 1383-1386, 1985.
- 10) Patsch, J. R., et al. J. Biol. Chem., 252, 2113-2120, 1977
- 11) 岡崎三代, 他・臨床検査, 27, 428-437, 1983.
- 12) 末平滋子, 他・臨床病理, 32, 1365-1371, 1984.
- 13) Muniz N., et al. Chin. Chem., 23, 1826-1833, 1977.
- 14) 安部彰・検査と技術, 18, 1463-1467, 1990.
- 15) Ornstein, L., et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321-349, 1964.
- 16) 米国特許 No 3,384,564
- 17) 末平滋子, 他・臨床病理, 35, 80-85, 1987.

- 18) 国立久男, 他 臨床病理, 35, 325-330, 1987. 20) Tazawa, Y., et al: J exp. Med., 130, 209, 1980.
19) 田澤雄作, 他 小児科診療, 40, 1598, 1977.

Detection of Serum Lipoprotein-X (LpX) by Electrophoresis on Slab Type Polyacrylamide Gel: Its Application to Selective Screening for CBA Using Serum

Atsushi Mikami, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi

A new method developed for detecting Lipoprotein-X (LpX) in serum, based on electrophoretic migration of the prestained sample through a slab type polyacrylamide gel is discussed. In this method, patterns of lipoprotein can be observed while simultaneously detecting LpX. With future improvements in mass screening techniques allowing a fuller, more comprehensive analysis, the method discussed here may be useful as a selective screening for CBA.