

アポリポ蛋白の免疫比濁法による測定と その診断的意義について

奈良県立医科大学中央臨床検査部

中井 忍, 出田 さよみ

清水 良純, 波賀 義正, 間瀬 忠

奈良県立医科大学病態検査学教室

岡本 康幸, 坂本 貞和, 辻井 啓之, 中野 博

STUDIES ON DETERMINATION OF APOLIPOPROTEINS BY TURBIDIMETRIC IMMUNOASSAY AND THEIR DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

SHINOBU NAKAI, SAYOMI IDETA,

YOSHIZUMI SHIMIZU, YOSHIMASA HAGA and TADASHI MASE

The Division of Central Clinical Laboratory, Nara Medical University

YASUYUKI OKAMOTO, SADAKAZU SAKAMOTO,

HIROYUKI TSUJII and HIROSHI NAKANO

Department of Clinico-Laboratory Diagnostics, Nara Medical University

Received September 20, 1990

Summary : Serum levels of apolipoproteins were determined in 386 outpatients without obvious metabolic disorder by turbidimetric immunoassay. By studies on linearity, repeatability, reproducibility and interference, this assay was confirmed to be applicable for routine laboratory tests. Clinical reference ranges in serum levels of apolipoprotein (apo) A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E were 92. 56-173. 79, 22. 11-40. 34, 52. 53-110. 37, 1. 39-5. 44, 4. 27-12. 94 and 2. 87-6. 38 mg/dl, respectively. Also, comparative studies on skewness and coefficient of variation in distribution of values were done with apo A-I and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and apo B and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol. The findings suggested that levels of apolipoproteins such as A-I and B are related to particle numbers of lipoproteins such as HDL and LDL, while cholesterol content in lipoproteins is affected by qualitative changes in particles as well. In coronary heart diseases, apo B and apo B/A-I ratios were significantly elevated and are suggested to be sensitive indicators for these diseases.

Index Terms

apolipoprotein, turbidimetric immunoassay, clinical reference range, lipoprotein, coronary heart disease

緒 言

アポリポ蛋白(アポ蛋白)は、リポ蛋白を構成する蛋白部分であるが、同時にリポ蛋白受容体との結合を介した細胞内への脂質の取り込みやリポ蛋白リパーゼやLecithin cholesterol acyltransferaseなどリポ蛋白代謝に重要な役割を演じる酵素の活性化に関与するなど多くの機能を有している¹⁾。したがって、総コレステロール(TCh)、トリグリセリド(TG)、高比重リポ蛋白コレステロール(HDL-Ch)などの今日一般に行なわれている脂質検査に加えてアポ蛋白の変動をみることは、脂質代謝異常の病態を解析するうえで有用であると考えられる。

アポ蛋白の測定系には一元免疫拡散法(SRID法)、ロケット免疫電気泳動法(ロケット法)、放射免疫測定法(RIA法)、酵素免疫測定法(EIA法)、免疫比濁法など各種の方法が応用されている²⁾。今回我々は、自動分析機に應用が可能な免疫比濁法によりアポ蛋白を測定し、基礎的検討を行ない、また冠動脈疾患におけるその診断的意義についても検討した。

対象および方法

1. 対象

本院各科外来を受診した20~60才の男女あわせて386名(男176名, 女210名)を対象とした。これらの例

は、正常血糖で乳白血清あるいはTGが400 mg/dl以上でないものとした。

また別に fresh な冠動脈疾患(以下CHDと略す)7名(すべて男性で、平均年齢54才)について検討した。

2. 方法

アポ蛋白A-I、A-II、B、C-II、C-III、Eは免疫比濁法(第一化学薬品製キット、アポオート「第一」使用)、血清脂質は酵素法、またHDL-Chはリントングステン酸Mg⁺⁺法による沈殿法にて測定し、低比重リポ蛋白コレステロール(LDL-Ch)は換算式を用いて計算した³⁾。なお測定は自動分析機日立7150にて行なった。臨床参考範囲(CRR)は既報により、度数分布計算による反復切断補正法にて算出した⁴⁾。

成績はすべて平均±標準偏差で表現し、平均値の差の検定はStudentのt-testにて行なった。

成 績

1. 免疫比濁法によるアポ蛋白測定の基礎的検討

a) 直線性

アポA-I 240 mg/dl, アポA-II 73.0 mg/dl, アポB 215 mg/dl, アポC-II 9.0 mg/dl, アポC-III 50.0 mg/dl, アポE 8.0 mg/dlまで良好な直線性が得られた(Fig. 1)。

b) 同時再現性

3種の血清についてそれぞれ20回測定を行ない、変動

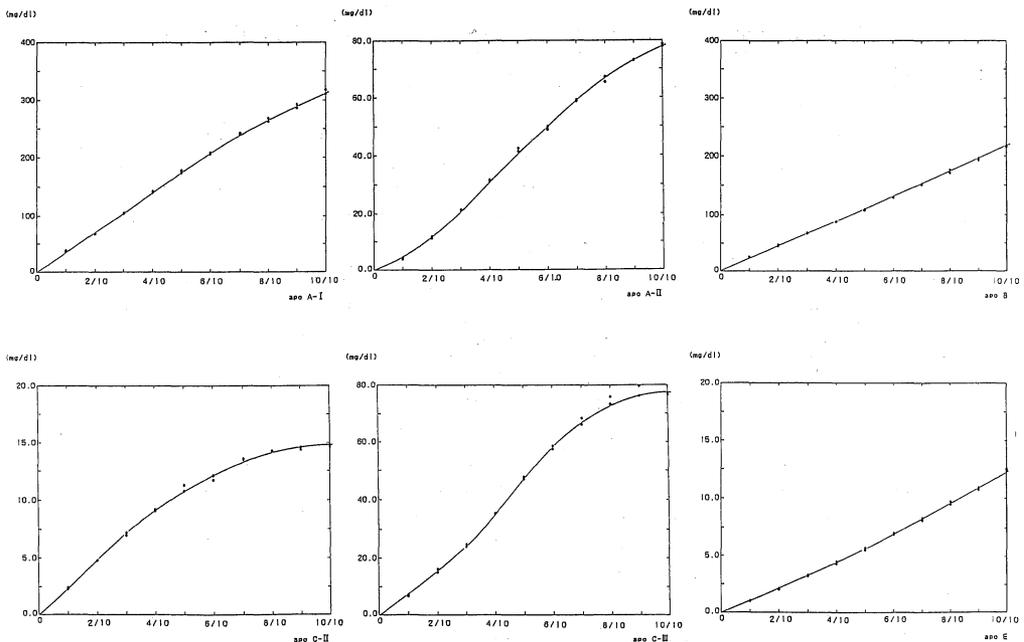


Fig. 1. Linearities in determination of apolipoprotein A-I, A-II, B, C-II, C-III and E.

係数 (CV) を求めた。各 CV はアポ A-I 0.88~1.73 %, アポ A-II 0.95~2.94 %, アポ B 1.25~2.80 %, アポ C-II 1.66~8.83 %, アポ C-III 1.86~9.06 %, アポ E 1.20~11.09 % であった。但し, アポ C-II, C-III, E において CV が 5 % を超えていたのはそれぞれ mean = 0.83, 2.03, 0.93 mg/dl の低い濃度を示した血清で, 中・高濃度にあった他の血清ではすべて CV が 5 % 以下と良好な結果が得られた。

c) 日差再現性

3 種類の血清を用いて 10 日間の日差再現性を検討したところ, 一部 (アポ C-III, E において mean = 3.090 mg/dl, 1.220 mg/dl で CV = 12.53 %, 10.08 % であったもの) を除いて CV が 5 % 以下であった。

d) 共存物質の影響

各アポ蛋白においてビリルビン, ヘモグロビン, 乳びの影響についてそれぞれを添加し測定を行なったところ, アポ C-III を除いてビリルビン 40 mg/dl, ヘモグロビン 550 mg/dl, 乳び 2.0 % までほとんど影響はみられなかった。アポ C III はビリルビン 20 mg/dl で約 18 % の正誤差, ヘモグロビン 550 mg/dl で約 16 % の正誤差, 乳び 2.0 % で約 8 % の正誤差となった。

2. 各アポ蛋白の年齢別, 性別変動と CRR の設定

Table 1 に年齢別, 性別におけるアポ蛋白値の変動を示した。アポ A-I は 20 才代と 40 才代の例で女性が有意に高値を示した。アポ A-II についてはあきらかな差はみ

られなかった。アポ B では, 20 才代の男性値よりも 30 才代の男性値の方が高値となり, 50 才代のアポ B は男女とも 40 才代よりも高値となった。アポ C-II では 30 才代の男性値が 20 才代の男性値よりも有意に高値を示し, 40 才代の女性値よりも 50 才代の女性値の方が有意に高値となった。また, 30 才以上の例で男性に比べ女性の方が有意に低値を示した。アポ C-III においては, 50 才代で男女とも 40 才代よりも高値となった。アポ E は, 30 才代の男性値が 20 才代の男性値よりも高値となり, かつ 50 才代は 40 才代よりも有意に高値となった。また 40 才代の女性値が 30 才代よりも高値を示した。

Table 2 は対象例のうち TCh 220 mg/dl 以下, かつ TG 150 mg/dl 以下の条件に合致する例でのアポ蛋白の CRR, および正規分布型における歪度を示している。HDL の主要な構成蛋白であるアポ A-I, および LDL の主要な構成蛋白であるアポ B の分布型は歪度の比較で見ると同一例の HDL-Ch や LDL-Ch に比べ正規分布への適合度は良好であった。また変動係数も, HDL-Ch 28.3%, LDL-Ch 29.5% であるのに対し, アポ A-I 16.7 %, アポ B 18.5 % といずれもアポ蛋白のほうが良好であった。

3. リポ蛋白中コレステロールと主要な構成アポ蛋白との関係

HDL の主要な構成蛋白であるアポ A-I と HDL-Ch, LDL の主要な構成蛋白であるアポ B と LDL-Ch の関係

Table 1. Serum levels of apolipoprotein A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E

Age	Sex	Case No	A-I (mg/dl)	A-II (mg/dl)	B (mg/dl)
20-29	Male	29	124.4±25.55	32.6±5.17	76.2±25.76
	Female	32	138.9±24.73*	30.4±6.00	84.7±20.23
30-39	Male	23	126.3±23.32	33.4±5.62	98.0±28.76
	Female	23	139.2±27.65	32.5±7.06	84.1±22.19
40-49	Male	54	121.2±28.10	31.8±6.86	92.2±21.12
	Female	82	135.6±23.52*	32.0±5.42	91.5±22.97
50-60	Male	70	128.5±27.26	32.7±8.15	104.0±29.57
	Female	73	135.7±21.66	33.2±6.73	104.5±24.31
Age	Sex	C-II (mg/dl)	C-III (mg/dl)	E (mg/dl)	
20-29	Male	3.09±1.358	8.73±5.150	4.36±1.411	
	Female	3.09±1.103	10.02±6.219	5.06±1.715	
30-39	Male	4.28±1.722	12.24±7.449	5.30±1.916	
	Female	3.16±1.310*	9.57±5.871	4.69±1.193	
40-49	Male	4.20±1.753	10.25±4.864	5.05±1.299	
	Female	3.54±1.484*	9.89±4.392	5.50±1.568	
50-60	Male	4.76±2.122	13.24±7.221	6.11±2.327	
	Female	4.03±1.314*	10.58±3.938*	5.69±1.396	

Data are expressed as mean±SD.

* p<0.05 compared with male data of same age-group.

p<0.05, p<0.01 compared with the preceding decade's data with same sex.

Table 2. Clinical reference range (CRR) and skewness for normal distribution of apolipoprotein A-I, A-II, B, C-II, C-III, HDL-Ch and LDL-Ch levels in cases with serum levels of TCh \leq 220 mg/dl and TG=150 mg/dl (Case number=186)

	A-I (mg/dl)	A-II (mg/dl)	B (mg/dl)
CRR	92.56~173.79	22.11~40.34	52.53~110.37
Skewness	0.055	0.055	0.145
	C-II (mg/dl)	C-III (mg/dl)	E (mg/dl)
CRR	1.39~5.44	4.27~12.94	2.87~6.38
Skewness	0.207	0.145	0.286
	HDL-Ch (mg/dl)	LDL-Ch (mg/dl)	
CRR	34.6~86.4	68.9~146.0	
Skewness	0.391	0.395	

Abbreviations used are described in the text.

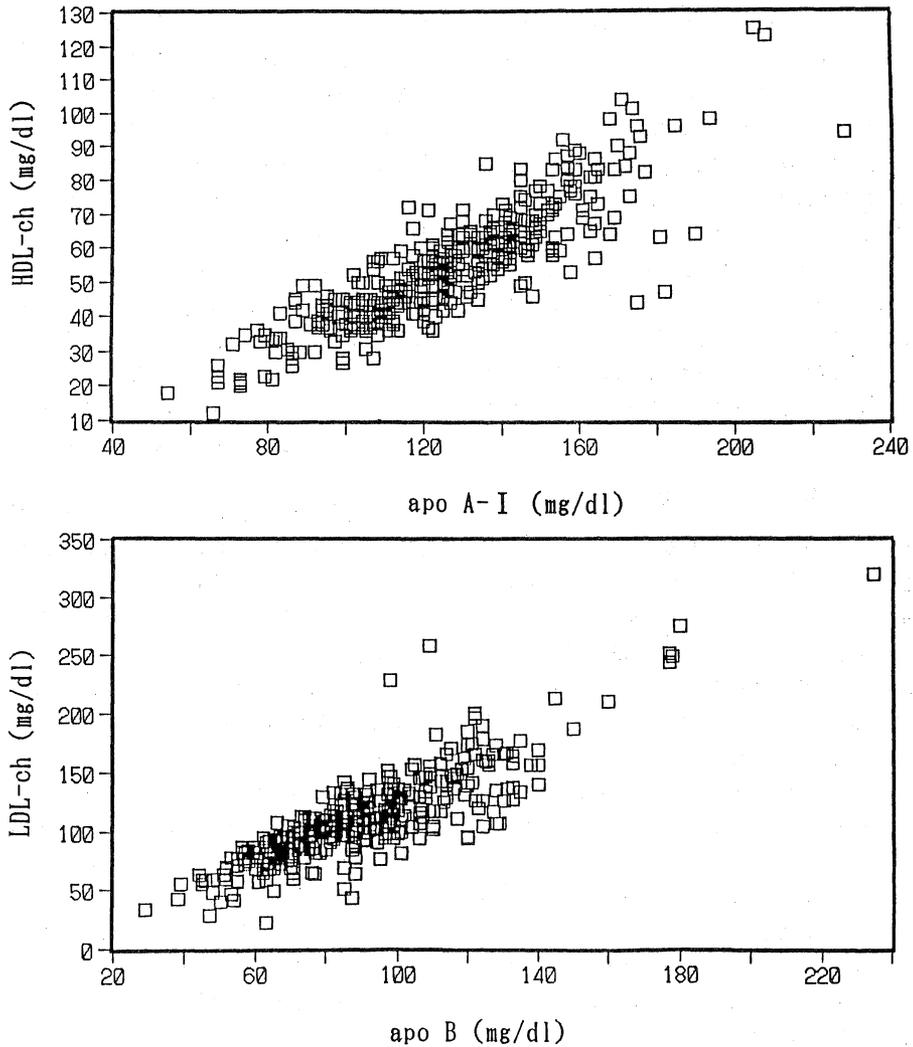


Fig. 2. Relationships between apolipoprotein A-I and HDL-Ch, and apolipoprotein B and LDL-Ch.

Table 3. Lipoprotein profile in patients with fresh coronary heart diseases (CHD)

	CHD (n=7)	Control (n=186)
TCh (mg/dl)	209.1±31.392	—
HDL-Ch (mg/dl)	42.33±7.659	—
LDL-Ch (mg/dl)	126.7±24.501	—
apo A-I (mg/dl)	125.9±29.808	128.3±21.74
apo B (mg/dl)	115.3±21.528 * *	78.5±14.32
HDL-Ch/A-I ratio	0.336±0.054 * *	0.445±0.053
LDL-Ch/B ratio	1.166±0.198 *	1.294±0.155
B/A-I ratio	0.93±0.164 * *	0.63±0.156

Data are expressed as mean±SD.

* p<0.05, * * p<0.01 compared with control.

Values of TCh, HDL-Ch and LDL-Ch are shown in Table 2.

Abbreviations used are described in the text.

を Fig. 2 に示す. いずれも, 良好な正の相関を示したが, 各アポ蛋白に対するコレステロール値には上限が存在することが示唆される分布となった.

4. CHD 例におけるアポ蛋白の変動

Table 3 は, CHD 例における脂質およびアポ蛋白値を示している. 参考値に比べ, アポ A-I はほぼ正常であったが, HDL-Ch は低値をとる傾向にあった. 一方, LDL-Ch は高値とは言えない例も多く含まれており, 全体として有意な変化はなかったが, アポ B はいずれの例でも高く参考値に対しても明らかな高値を示した. そのためアポ B/A-I 比は高値を示した. また HDL-Ch/アポ A-I 比は有意な低値を示し, LDL-Ch/アポ B 比も低値を示した.

考 察

自動分析装置を用いての免疫比濁法によるアポ蛋白測定は直線性, 同時再現性, 日差再現性, 共存物質の影響の検討成績からみて, 日常のルーチン検査に充分適応可能であると考えられた. また, アポ蛋白測定値の性差は A-I および C-II で軽度認められ, A-I では女性が, また C-II では男性が高値を示す傾向がみられた. 加齢による影響は B, C-II および E で年齢とともに次第に増加する傾向がみられた. 今回求められた各アポ蛋白の CRR は, 今までに報告されているものとはほぼ一致した成績を示している⁹⁾.

ところで, 今日一般的には, HDL や LDL などのリポ蛋白の変動は, リポ蛋白中のコレステロールである HDL-Ch や LDL-Ch の変動により検討されている. しかし, アポ A-I と HDL-Ch, アポ B と LDL-Ch の歪度および変動係数の比較から見てもわかるように, リポ蛋白中コレステロールは比較的多くの変動因子の影響を受ける

と考えられるのに対して, リポ蛋白中の主要なアポ蛋白は各リポ蛋白の量的な変動(粒子数)をよく反映すると考えられる(例えば LDL 1 粒子当たり 1 分子のアポ B がついていることが知られている⁶⁾). よって, 各アポ蛋白の変動は, それぞれのリポ蛋白の量的な変動を表現するものとしては脂質検査より優っているものと考えられる. また, リポ蛋白中コレステロールはリポ蛋白の量的変動および質的变化の総和を表現しており, また, それらの比率はリポ蛋白の質的变化の一部を表現し得ると推察された. さらに, アポ A-I と HDL-Ch, アポ B と LDL-Ch の相関図から, 各アポ蛋白に対するコレステロール値には上限が存在することが示唆される分布となっており, 各アポ蛋白に対応するコレステロール濃度には飽和量が存在するのではないかと考えられる. したがって, アポ蛋白とリポ蛋白中コレステロールの比をとることによって各リポ蛋白の構造上の変化が推測できるかもしれない. 最近我々は, HDL-Ch/アポ A-I 比が HDL の亜分画の変動と関連が深いという成績を得ている(臨床病理 in press).

CHD では, TCh や LDL-Ch が高値をとる傾向や HDL-Ch の低値傾向が認められたが, より明瞭な変化はアポ B に認められており, その結果アポ B/A-I 比は高値を示し, HDL-Ch/アポ A-I 比, LDL-Ch/アポ B 比はそれぞれ低下していた. これは, 本疾患の危険因子の評価にアポ B の値や B/A-I 比がより有用であることを示唆する所見と考えられる. また, LDL-アポ B の増加に対して, LDL-Ch が正常な場合があり, CHD との関連の深いことが紹介されているが⁷⁾, このことも我々の成績を支持するものと考えられる.

結 語

以上の成績から、

1. 自動分析機での免疫比濁法によるアポ蛋白測定は日常ルーチン検査に適応可能と思われた。
2. アポ蛋白測定値の性差はA-I, C-IIで軽度認められ、B, C-II, Eで加齢による増加傾向が認められた。
3. 各リポ蛋白の量的な変動を表現するものとしては、変動因子の多いリポ蛋白中コレステロールよりも各リポ蛋白を構成する主要なアポ蛋白の変動の方が優っていると考えられた。
4. リポ蛋白中コレステロールはリポ蛋白の量的変動および質的变化の総和を表現すると考えられた。
5. 主要なアポ蛋白とリポ蛋白中コレステロールとの比率は、リポ蛋白の質的变化の一部を表現すると推察された。
6. CHDの危険因子の評価にアポBやB/A-I比の有用性が示唆された。

文 献

- 1) 山本 章, 山村 卓, 横山信治: アポ蛋白異常と病態. 代謝 **22**: 647-656, 1985.
- 2) 古賀俊逸: アポ蛋白の免疫学的測定法. 臨床検査 **28**: 1676-1680, 1984.
- 3) Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S.: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. **18**: 499-502, 1972.
- 4) 岡本康幸, 中野 博, 波賀義正, 清水良純, 河本弘美: 生化学検査データの臨床参考範囲(CRR)設定に関する検討. 奈良医学雑誌 **40**: 293-300, 1989.
- 5) 野間昭夫, 五島雄一郎, 秦 葭哉: 免疫比濁法によるアポ蛋白A-I, A-II, B, C-II, C-III, Eの正常値の検討. 動脈硬化 **16**: 832, 1988.
- 6) Schaefer, E. J., Eisenberg, S. and Levy, R. I.: Lipoprotein apolipoprotein metabolism. J. Lipid Res. **19**: 667-687, 1978.
- 7) Sniderman, A., Shapiro, S., Marpole, D., Skinner, B., Teng, B. and Kwiterovich, P. O. Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 604-608, 1980.

1) 山本 章, 山村 卓, 横山信治: アポ蛋白異常と病