

リポ蛋白異常症のスクリーニング

武 内 望

(愛媛大学医学部附属病院)
中央検査部

先天性の血清リポ蛋白異常はアポ蛋白の欠損や変異, 脂質代謝酵素の異常ならびにリポ蛋白レセプターの障害によるものがある(表1)。血清リポ蛋白は比重の軽いものから超低比重リポ蛋白(VLDL), 中間比重リポ蛋白(IDL), 低比重リポ蛋白(LDL), 高比重リポ蛋白(HDL)に大別され, VLDLにはトリグリセライド(TG), LDLにはコレステロール(Ch)が多く含まれる。そのためリポ蛋白異常のマスキングは自動分析法により容易に定量しうる

表1 先天性リポ蛋白異常

1. アポ蛋白欠損および変異		
アポA	欠損	Tangier病
	変異	アポA-I Milano, アポA-I Marburg 魚眼症
アポB	全欠損	無 β リポ蛋白血症
	一部欠損	肝性 β リポ蛋白欠損(Malloy)
	減少	低 β リポ蛋白血症
アポC	C _{II} 欠損	I型高リポ蛋白血症
	C _{III-0} 欠損	
	C _{II} /C _{III} 低下	IV型高リポ蛋白血症
アポE	E ₃ 欠損	III型高リポ蛋白血症
	E変異	
2. 酵素異常		
リポ蛋白リパーゼ	欠損	I, V型高リポ蛋白血症
肝TGリパーゼ	欠損又は減少	III型高リポ蛋白血症
LCAT	欠損	LCAT欠損症
TG合成酵素	活性増加	IV型高リポ蛋白血症
26水酸化酵素	欠損	脳膜黄色腫
3. レセプター異常		
アポB	欠損, 減少	IIa型高リポ蛋白血症
	転送障害	
アポE, EB		III型高リポ蛋白血症?

TG, Ch によって行うことができ、両者の値により VLDL, LDL の異常と IDL の増加例を抽出しうるし、他のリポ蛋白の定量法に較べ最も簡便である。

しかし HDL 中の TG や Ch は VLDL, LDL に較べて少量であるため、HDL の異常は VLDL, LDL によりマスクされてしまうことになる。近年、血管病変との関連より、臨床的に HDL の重要性が認識され、種々の先天性リポ蛋白異常症が発見されているため、HDL の異常をも検出しなくてはならず、すでに指摘したように¹⁾ HDL コレステロール (HDLC) を加えてスクリーニングを行う必要がある。この三種類の血清脂質値を知ることにより、血清リポ蛋白の異常を十分拾い上げることができ、さらに異常例につき詳しいリポ蛋白の分析を行って病態や成因についての検討を加えるべきである。

実験方法

血清 Ch が 250 mg/dl, TG が 200 mg/dl 以上, HDLC が 35 mg/dl 以下の一次性血清リポ蛋白

表 2 リポ蛋白分析法

-
1. リポ蛋白分離法
 - a. 超遠心法
分離超遠心法, ゾーナル超遠心法
 - b. クロマトグラフィー
DEAE セルロース, アガロース, セファロース, セファデック
ス, ハイドロオキシアパタイト, ヘパリンセファロース
 - c. ポリアニオン法
ヘパリン, デキストラン, 燐タングステン酸
 - d. 高速液体クロマトグラフィー
 - e. 免疫法
 2. 脱脂法
 - a. 有機溶媒混合液
アセトン・エタノール, エーテル・エタノール, クロロフォルム・メタノール, n-ブタノール, イソプロピルエーテル
 - b. テトラメチル尿素
 3. 分析法
 - a. 電気泳動法
アガロース平板法, セルロースアセテート膜法, デスク法, ス
ラブル法, 等電点電気泳動法
 - b. 免疫法
RIA, SRID
 - c. 免疫電気泳動, ロケット法
-

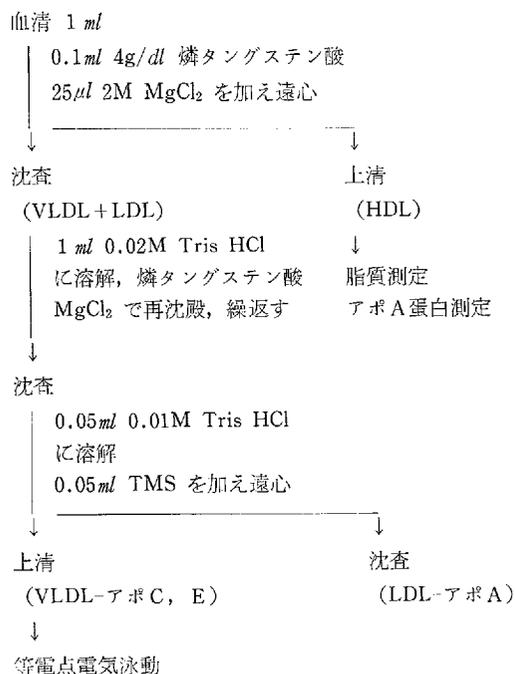


図1 リポ蛋白異常のスクリーニング

白異常例につき、空腹時血清を採取して各脂質を酵素法により測定し、カイロミクロンやIDLの検出およびWHO分類のため、アガロースゲル平板による血清の電気泳動を行った。脂質はFat Red 7Bで染色を施し、デンストメーターにより各リポ蛋白バンドの染色度を読み取った。HDLは燐タングステン酸とMgCl₂によりLDL, VLDLを沈殿除去し、上清画分の脂質を酵素法で測定し、そのアポA蛋白を免疫比濁法で測定した。各リポ蛋白画分の分離はHatch-Leesの方法によって行い、そのCh, TG, 燐脂質, 蛋白量を定量し、これらの和をリポ蛋白濃度とした。一部の症例ではSRID法によりアポA_I, A_{II}, C_{II}, E蛋白を測定した。

成績および考察

1. VLDL アポ蛋白の分析法¹⁾

すでに報告したように¹⁾, リポ蛋白中のアポ蛋白の分析には(a)目的とするリポ蛋白の分離, (b)リポ蛋白の脱脂, (c)電気泳動法などによるサブクラスの分析が必要である。現在これらの目的で用いる方法は表2に示した。これらのうち多数検体の処理が可能で, スクリーニングに適した最も簡便で再現性がよく, 精度の高い方法について検討した。その結果VLDLのアポCおよびE蛋白に関しては図1に示したように血清1 mlより出発し, 燐タングステン酸によるHDLの除去, テトラメチル尿素(TMS)による脱脂とアポB蛋白の分離, pH 4.0~6.0アンフォライト, 8 M 尿素を含む平板ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動によるVLDLア

ポ蛋白分画の三者を組み合わせる方法が最も適していることを認めた¹⁾²⁾。等電点電気泳動法によるアポ蛋白サブクラスのデンシトメトリーによる同時再現性は、20%以上を占める濃いバンドでは CV は 3~4%と良好な結果であるが、薄いバンドでは CV 値が大きくなる。したがってアポ E 蛋白のサブクラスの個々の値は再現性が悪いため、アポ E 蛋白は総量で表わすことにした。一枚の平板で一度にほぼ25検体の処理が可能である。TMS で脱脂した後、沈殿したアポ B 蛋白画分は SDS で可溶化して分析することができるが、今回はその検討は行わなかった。

2. HDL アポ蛋白の分析法

燐タングステン酸・MgCl₂ 処理によりえられる上清画分の HDL には、その他の血清蛋白を含むため、脂質の定量は可能であるが、電気泳動によるアポ蛋白の分析には用いえない。そのため免疫学的手法によらざるをえず、それには RIA 法、SRID 法、ロケット免疫電気泳動法が日常用いられている。しかし、より簡便な方法として免疫比濁法があるため、遠心式分析器に適用してアポ A 蛋白の測定を試みた³⁾。抗血清として、抗ヒトアポリポ蛋白 A 羊血清を用いた。基礎的検討では SRID 法との相関は $r = 0.984$ であり、同時再現性も $CV = 2.2 \sim 2.4\%$ と良好であり、血清アポ A 蛋白の定量には十分用いることが判明した。超速心法で分離した HDL 中のアポ蛋白の 70~80%がアポ A 蛋白であり、血清脂質正常者ではほとんどのアポ A 蛋白が HDL 中に含まれるが、高 TG 血症例ではアポ A 蛋白はその程度に応じて VLDL 画分中にも分布していた。

3. 高リポ蛋白血症における VLDL アポ蛋白の異常

分析を行った一次性高リポ蛋白血症は、IIa 型83例、IIb 型45例、IV型49例であり、まれな疾患とみなされ、カイロミクロン血症を伴う I 型は 1 例、V型は 5 例、IDL の増加した β -ブロード病 (III型) は 5 例であった。低 HDLC 血症は34例について分析を行った。

等電点電気泳動法による各高リポ蛋白血症での VLDL アポ蛋白の解析を行った結果、IIa 型では正常人と差がみられなかったが、高 TG 血症を有する IIb、III、IV型と低 HDLC 血症では C_{II} に対する C_{III} の割合が高かった^{4)~6)}。C_{II}/C_{III} 比の大きさによる症例の分布をみると IIa 型では正常例の分布と著しい変化はなかったが、IIb、IV型および低 HDLC 血症では C_{II}/C_{III} 比の大きい例が多い傾向であった⁵⁾⁶⁾。

アポ C_{II} 蛋白はリポ蛋白リパーゼの活性化因子、アポ C_{III} 蛋白はその阻害因子と考えられており、C_{II} の欠損によりカイロミクロン血症 (V型) が出現する。また C_{II}/C_{III} 比の低下した高リポ蛋白血症も報告されている⁵⁾。しかし今回の多数例の検討では、高 VLDL 血症では必ずしも C_{II}/C_{III} 比の低下は認められず、むしろ高い傾向が示された。SRID で C_{II} 濃度の測定を行った結果では、高 VLDL 血症で C_{II} 濃度が増加しており、血中 TG および VLDL 濃度と正の相関関係が認められた。このように高 VLDL のきわめて一部の症例で C_{II}/C_{III} 比は成因而として重視されるが、一般の高 VLDL 血症では他の因子の関与を考えなくてはならないであろう。

さらに高 VLDL 血症ではアポ C_{III} のサブクラス中、C_{III-0} の増加がみられた^{4)~6)}。C_{III-1} には 1 ケのシアル酸、C_{III-2} には 2 ケのシアル酸が含まれているため、 $C_{III-1} + C_{III-2} \times 2 / C_{III-0} + C_{III-1} + C_{III-2}$ (それぞれ各サブクラスの百分率) をシアル化の指数とすると、IIb, III, IV 型ではこの指数が正常対照群や IIa 型より有意に低値であった^{4)~6)}。すなわち高 VLDL 血症例ではアポ C_{III} のシアル化が低下していることを意味する。糖負荷により TG や VLDL の合成分泌が亢進した場合には、このようにシアル化の少ないアポ C_{III} 蛋白が増加するため、高 VLDL 血症では VLDL 合成の促進により、シアル化の十分行われていないアポ蛋白画分が増加するものと考えられる。

今回発見された I 型、V 型の高リポ蛋白血症ではアポ C 蛋白のサブクラスには異常がなく、全員リポ蛋白リパーゼの欠損によるものであった。また、アポ C_{II}/C_{III} 比は加齢によりむしろ増加することが認められた⁷⁾。潜在的な脂質代謝異常は加齢に伴う代謝障害により増強され、リポ蛋白が増加するであろうが、このような変化はアポ C 画分の変化によるものでないと考えられる。

4. 高リポ蛋白血症における HDL の変化⁸⁾⁹⁾

燐タンゲステン酸を用い分離定量した HDLC は、正常群と IIa 型では差はなかったが、IIb, III, IV 型および I, V 型では低値であった。これに対し HDL アポ A 蛋白濃度は IIb 型では正常群や IIa 型と全く差がなく、その他の高リポ蛋白血症では低値であったが、その程度は HDLC の低下より軽度であった。このことは、HDL 中のアポ A 蛋白に対して Ch が少く、とくに遊離型の変化が軽度のためエステル型 Ch が少ないことを示している。さらに HDL 中の TG は IIb, III, IV 型で増加しており、I, V 型でも同じ傾向であるため、アポ A 蛋白に対し TG が多くなっていることを示唆する。すなわち高 VLDL を伴う群では、HDL のエステル型 Ch が減少し、代わりに TG が増加していることになる。両者はいずれも疎水性物質であり、リポ蛋白粒子の中心部分に存在する。両者の和とアポ A 蛋白の比を計算すると、I, V 型を除きほぼ一定の値となり、HDL 粒子の中心部に含まれている疎水性脂質の割合は、各リポ蛋白血症でも変化はないと考えられる。

HDL 粒子の膜面に存在する遊離型 Ch は、レシチン:コレステロール脂肪酸転位酵素(LCAT, EC 2, 3, 1, 43) の作用によりエステル型となり、粒子の中心部に移動するが、一部は血中のコレステロール・エステル転送蛋白により VLDL へ移される。VLDL からはそれに見合った量の TG が HDL へ移行するとされており、血中で HDL に較べて VLDL が多い場合にはこの交換反応も活発となり、TG を多く含んだ HDL ができると考えられる。低 HDL 血症でも同様な機序が働き、比較的エステル型 Ch が少く、TG が多い HDL が生ずるであろう。

超遠心法で分離して測定した HDL 濃度とその HDLC 濃度との相関係数は $r = 0.694$ であり、HDL と HDL アポ A 蛋白との相関係数 $r = 0.899$ より低い。

したがって高 VLDL 血症や低 HDL 血症では、HDLC によって HDL の濃度やいわゆる動脈硬化指数 (atherogenic index) を推定すると実際の値より低く評価するおそれがあり、これ

らの症例ではアポA蛋白濃度を測定しなくてはならない。IV型では動脈硬化の発生頻度が少ないにもかかわらず、HDLCが低いといわれているが、実際にはHDLCで判断するほどHDLは低値ではないといえよう。

5. LCAT 欠損症の一家系¹⁰⁾¹¹⁾

低HDL血症患者の検索中、エステル型コレステロールの著しく低い症例が見出された。特記すべき自覚症はないが、角膜濁を伴い、軽度の貧血と蛋白尿が認められた。LCAT活性は13 nmoles/ml/hr(正常値80~120 nmoles/ml/hr)であり、肝機能には障害がないためLCAT欠損症と考えられた。LCATは磷脂質の一成分であるレシチン(フォスファチジル・コリン)のβ位の脂肪酸をChへ転位させてエステル化するため、この酵素が欠損すれば、当然磷脂質の変化も起らなくてはならない。この症例の血清磷脂質画分では、レシチンの増加と脂肪酸の1ヶ少ないリゾレシチンの減少が認められた。

光顕では、赤血球には若干の標的細胞と14%の有舌細胞が存在し、電顕的にも確認した。血球の膜蛋白には異常がなかったが、Chと磷脂質は増加し、磷脂質画分ではレシチンの増加とフォスファチジル・エタノールアミンの減少がみられた。血球容積は正常より大きく、変形能に豊み、網状赤血球が増加しており、血球寿命の短縮と増血機能の亢進が示唆された。

電気泳動ではβ-リポ蛋白とプレβ-リポ蛋白が分離せず、易動度は遅く、α-リポ蛋白は著しく減少していた。HDLの減少は顕著であり、そのアポA蛋白の減少、アポA_I/A_{II}比の増加、Chエステルの著しい減少とTGの増加が認められた。2%アガロースゲルやセファデックスクロマトグラフィーでHDL、VLDLを分画すると、種々の異なったサイズのリポ蛋白の粒子が見出され、リポ蛋白の異型性に富むことが示唆された。LDLには正常では存在しない大型のリポ蛋白が検出された。

家族調査では両親が従兄弟結婚であり、血清脂質などの精査を行えた14例のうち、3人兄弟姉妹の末弟の1例と、父方の叔母1例にLCAT活性の著しい低下例が認められ、24才の末弟には明らかな角膜濁がみられた。

家族中臨床症状はないが、LCAT活性が正常人のほぼ半分の例が8人発見された。従来LCAT欠損症は劣性遺伝と考えられていたが、最近優性とみなされる家系も報告されており、本症例も優性遺伝によると考えられる。

本家系はわが国における三家系めであり、リポ蛋白のスクリーニングにより、さらに先天性リポ蛋白異常症を検出しようであろう。

おわりに

血清Ch、TG、HDLGの異常値によりスクリーニングした一次性的リポ蛋白異常例につき、VLDLアポ蛋白の分析、HDLアポA蛋白の定量を行い次の結果をえた。

1. リポ蛋白リパーゼ活性化因子であるアポC_{II}蛋白とその阻害因子のアポC_{III}の比は、高VLDL血症を有する例では増加しており、この比は必ずしも高VLDL血症の成因とはなら

ない。

2. アポ C_{III} 蛋白のシアル化は、高 VLDL 血症で低下しており、VLDL 合成増加を反映するものと考えられる。

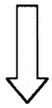
3. 高 VLDL 血症では、HDLC は有意に低下していたが、アポ A 蛋白の減少は HDLC より軽度であり、HDL 中のエステル型 Ch の減少と TG の増加が示された。

4. 低 HDL 血症例で LCAT 欠損症が発見され、家族調査によりさらに 2 症例が追加された。これらの症例につき血清リポ蛋白、赤血球異常の検索を行った。

5. リポ蛋白異常のスクリーニングにより、今後このような先天性リポ蛋白異常症を検出するであろう。

参 考 文 献

- 1) 武内 望：先天異常のモニタリングに関する研究，昭和55年度研究報告書，p.136～142.
- 2) 片山善章，武内 望：血清リポ蛋白の等電点分画法．臨床病理，**29**：680～686，1981.
- 3) 片山善章，川口光美，武内 望：免疫比濁による血清アポタンパク A の自動分析法とその臨床的応用．日本臨床検査自動化学会誌，**7**：317～321，1982.
- 4) 武内 望，川口光美，ら：高リポ蛋白血症と VLDL アポ C 蛋白．臨床化学シンポジウム，**21**：163，1981.
- 5) Takeuchi, N., Kawaguchi, T. et al.: Apo C proteins in VLDL of hyperlipidemic patients. Jpn. J. Clin. Chem., **11**：56～62, 1982.
- 6) 武内 望：先天異常のモニタリングに関する研究，昭和56年度研究報告書，p.145～152.
- 7) Takeuchi, N., Matsumoto, A. et al.: Changes with aging in serum lipoproteins and apolipoprotein C subclasses. Arch. Geront. Geriat., in press.
- 8) 武内 望，片山善章，ら：高トリグリセライド血症における血清高比重リポ蛋白の変化．脂質生化学研究，**24**：385～388，1982.
- 9) Takeuchi, N., Katayama, Y. et al.: Relationship between serum apolipoprotein A and HDL cholesterol in the patients with various hyperlipoproteinemias. Anal. Clin. Specim., **5**：68～76，1982.
- 10) 武内 望，松本明美，ら：ストマトサイトーシスを伴う LCAT 欠損症とその血清リポ蛋白の分析．臨床化学シンポジウム，**22**：印刷中.
- 11) 武内 望，松本明美，ら：レシチンコレステロール脂肪酸転位酵素欠損症．代謝，**20**：81～88，1983.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



先天性の血清リポ蛋白異常はアポ蛋白の欠損や変異, 脂質代謝酵素の異常ならびにリポ蛋白レセプターの障害によるものがある(表 1)。血清リポ蛋白は比重の軽いものから超低比重リポ蛋白(VLDL), 中間比重リポ蛋白(IDL), 低比重リポ蛋白(LDL), 高比重リポ蛋白(HDL)に大別され, VLDL にはトリグリセライド(TG), LDL にはコレステロール(Ch)が多く含まれる。そのためリポ蛋白異常のマスクリーニングは自動分析法により容易に定量しうる TG, Ch によって行うことができ, 両者の値により VLDL, LDL の異常と IDL の増加例を抽出しうるし, 他のリポ蛋白の定量法に較べ最も簡便である。

しかし HDL 中の TG や Ch は VLDL, LDL に較べて少量であるため, HDL の異常は VLDL, LDL によりマスクされてしまうことになる。近年, 血管病変との関連より, 臨床的に HDL の重要性が認識され, 種々の先天性リポ蛋白異常症が発見されているため, HDL の異常をも検出しなくてはならず, すでに指摘したように HDL コレステロール(HDL-C)を加えてスクリーニングを行う必要がある。この三種類の血清脂質値を知ることにより, 血清リポ蛋白の異常を十分拾い上げることができ, さらに異常例につき詳しいリポ蛋白の分析を行って病態や成因についての検討を加えるべきである。