[シンポジウム：生化学検査の標準化と測定の高感度化]

Lp(a)測定の標準化と疾患における意義

久保野勝男^{*,**}・櫻林郁之介^{***}

SUMMARY

In order to standardize the lipoprotein(a) [Lp(a)] measurement, the International Federation of Clinical Chemistry Working Group on Lp(a) (IFCC Lp(a) WG) and the Japan Society of Clinical Pathology Working Group on Lp(a) Standardization were established in 1995, 1994, respectively. In the activities on IFCC Lp(a) WG, eight proposed reference materials (PRM) were compared for their analytical performance, commutable properties, method harmonization, and selected PRM-2B (Behring) as the most suitable PRM. In the next phase of the IFCC Lp(a) WG, a value transfer protocol will be used to transfer a Lp(a) value from the PRM-2 for Lp(a) to manufactures' master calibrators, and WG will submit the results to WHO. On the other hand, it is recommended that the Lp(a) protein concentration should be expressed in molar units for more accurate Lp(a) measurement. So it will be expected that new clinical estimation is investigated.

Key words: lipoprotein(a), standardization, proposed reference material, primary standard, harmonization.

はじめに

Lipoprotein(a) [以下 Lp(a)] は、1963 年ノルウェーの遺伝学者 Berg らによって低比重リポタンパク (LDL) の遺伝性変異として報告されたりポ蛋白であり¹⁾、1987 年には Maclean らがその cDNA の構造解析をしている²⁾。Lp(a) の特異蛋白部分である apo(a) 構造がプラスミノゲンと類似することなどから、動脈硬化性疾患との関連性についてこれまで多くの研究が重ねられてきた^{3,4)}。Lp(a) の測定には ELISA や自動分析装置を使った免疫比濁法 (TIA や LTIA) などの定量的測定法が日常検査に多く用いられている。Lp(a) 値は各試薬メーカーが独自に設定したキャリブレーターによって値付けされており、標準物質という

ものが設定されていない中で、多くの評価がされてきた。そのため、方法や試薬間におけるデータ差異が少なからず発生し、データ統一に向けた標準化の必要性が出てきた。

Lp(a) 測定に関する標準化については、1989 年米国の CDC (Centers for Disease Control and Prevention) が主催した精度管理調査を機に提起された。1990 年の AACC 会期時に IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) により Lp(a) 免疫測定 of 標準化に関する提案がされ、1995 年 4 月より IFCC Lp(a) 標準化に関するワーキンググループ (IFCC Working Group on Lp(a), 以下 IFCC Lp(a) WG) として具体的な活動が開始された⁵⁾。

一方、我が国では 1993 年 12 月に日本臨床病理学会

Standardization for Lp(a) measurement and clinical investigation.

* Katsuo Kubono; 株式会社エスアールエル研究検査部

** Katsuo Kubono; 杏林大学医学部生化学第二

*** Ikunosuke Sakurabayashi; 自治医科大学大宮医療センター総合医学 I, 検査部

Correspondence address: Katsuo Kubono, SRL, Inc., 153, Komiya-cho, Hachioji, Tokyo 192-0031 Japan.

第 48 回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

の標準化委員会の中に「アドホック Lp(a)標準小委員会」(河合忠委員長)が組織され、Lp(a)測定に関する実態調査や標準物質統一によるキット間差を正に向けた活動を行ってきたが、現在は IFCC と歩調を合わせて進めている⁶⁾。ここでは IFCC Lp(a)WG の標準化活動を中心に、これまでの検討結果を紹介しながら標準化の状況報告をする。また、これに伴って Lp(a)の測定意義に対する再評価の可能性についても触れる。

Lp(a)測定の標準化

IFCC Lp(a)WG (委員長は Marburg 大学の Prof. Armin Steinmetz) は、オーストリア・ドイツ・ノルウェー・フランス・アメリカ・オーストラリア・日本(櫻林・自治医大)の代表計 7 名からなる委員で構成されている(表 1)。

WG での標準化の手順については第 1 回の会議(1995 年 4 月、ドイツ)の折りに次の 3 点に絞って行うことが合意され、これに沿って検討されてきた。

- ① Primary Standard の作成
- ② Reference Material への値の assignment
- ③ Reference Material の選択法

1. Reference Material の選択

国内では各試薬に添付されているキャリブレーターは様々であり、その値付けについては各企業の基準によって実施されているのがほとんどである。ただし、国内の Lp(a)測定値は先行試薬の値が目安となっていたためか、各社ほぼ同様な数値となっている。各キャリブレーターの性状やマトリクスは様々であり、試薬が異なれば同じキャリブレーターを使用することができない。そのため試薬とキャリブレーターは対で用いられるのが常となっている⁷⁾。

IFCC Lp(a)WG で先に進められた作業は Reference Material の選択である。新たに Reference Material

を作成するというのではなく、既存の物質から適したものを選択するという考え方で作業が進められた。すなわち、各国企業で保有している Reference Material のうち適していると思われるものが提出され、本委員会が主催した 2 度にわたるサーベイ(世界 35 施設が参加)が実施された。Linearity, Parallelism, Reproducibility などについて評価がなされ、Commutability, Harmonization を考慮した上で、候補にあがった 8 つの Proposed Reference Material: PRM 候補品から第一段階で 4 つの候補品(オーストリア、ドイツ、アメリカ、日本)が、次の段階で 2 つの PRM 候補品(オーストリアとドイツ)が選択された。

図 1 は第一段階で検討した 4 つの PRM 候補品(それぞれ PRM-1, 2, 3, 5)について Lp(a)phenotype を確認したものである。PRM-1 のように単一 phenotype のものと他の PRM のように複数の phenotype を含むものがある。PRM として選定するには、できるだけ人血清に近い組成が望ましいと考えられた。

様々な角度から評価と討議を重ね、今年の夏に最終的な 1 種の PRM の絞り込みがされ、PRM-2B: Behring (ドイツ)のものが選択された。

P 5 M 3 2 1 F M

sample	phenotype
1	S 1
2	(F), B, S 1, S 2
3	S 1, S 2, S 3
5	B, S 1
F	B, S 3, S 4
Marker	F, B, S 1, S 3

図 1. 各 PRM の Lp(a)phenotype.

表 1. IFCC Lp(a)WG の委員一覧。

委員長: Prof. Armin Steinmetz (St. Nikolaus-Stiftshospital)	
委員:	
Prof. Kare Berg (Univ. of Oslo)	
Dr. Remi Couderc (Tenon Hospital)	
Prof. Gerhard Kostner (Univ. of Graz)	
Dr. Nader Rifai (Children Hospital)	
Prof. I. Sakurabayashi (JMC Omiya Med. Center)	
Mrs. Jill Tate (Princess Alexandra Hospital)	
Dr. Francesco Dati (DADE Behring): Secretary	

2. Primary Standard の作成

やや遅れて実施された Primary Standard の作成については、委員の一人である Prof. Kostner (オーストリア・Graz 大学) が単一の phenotype (homozygote, Kringle IV 21-24 程度) を持つ血清から Lp(a) を精製し、蛋白量、アミノ酸分析、各脂質組成等の分析から Lp(a) 量を求めることを提案し、昨年 Prof. Kostner が精製した 2 種類の Primary Standard 候補品を、オーストリア・アメリカおよび日本において分析・評価を実施した。

Kostner より送付された Lp(a)-1, Lp(a)-2 と呼ばれる 2 つの Primary Std 候補品について、脂質組成、phenotype, アミノ酸分析などの確認実験を行った。図 2 はリボ蛋白組成を示したものである。

Lp(a)-2 ではベータ位側にテーリングが見られ、生成段階での変性か、他の蛋白のコンタミが予想された。これはのちの Kostner からの報告によるとコン

タミがあったとのことであった。

図 3 は 2 つの Primary Std 候補品のイムノプロットである。

SDS-PAGE ののちに Western プロットを行ったところ、Kringle IV 数でそれぞれ 21 ないし 23 の位置に単一バンドが確認された。さらにこれら候補品のアミノ酸分析を実施した。アミノ酸分析は、塩酸加水分解後に日立アミノ酸分析装置 L-8500 による分析を実施した。なお、加水分解条件が一部アミノ酸に影響を及ぼすことを想定し、参考までに塩酸加水分解とメタン

Marker Lp(a)1 Lp(a)2

number of
kringle IV

図 2. Primary standard 候補品のリボ蛋白電気泳動。

図 3. Primary standard 候補品のイムノプロット。

図 4. Primary standard 候補品のアミノ酸組成比の比較。

スルホン酸加水分解を比較したが、大きな差異は認められなかった。

Lp(a)のアミノ酸組成が既に明らかにされているので、理論的に計算した各アミノ酸組成と我々の実測値、Kostner らの実測値の比較を図4に示した。一部のアミノ酸組成比に差異はあるものの、ほぼ満足のいく結果であった。

これらの脂質組成の分析やアミノ酸組成の結果から、候補品のLp(a)濃度を算出した。なおLp(a)濃度の表記方法はmole表示とすることが合意された。

3. PRM への値付け

Primary Std および PRM についての設定作業がほぼ終了し、次に Primary Std を用いて PRM に値付けを行うステップに進んだ。

Reference Method として Kostner らは DELFIA 法を推奨しているが、我々は国内で使用しているいくつかの方法によって検討を実施することとした。我々が検討したデータの一部を示す。図5はStdにLp(a)-1を用いて、PRMを4つの方法を用いて測定したものである。

トクヤマはポリクローナル抗体によるLTIA法、第一はモノクローナル抗体によるLTIA、ベーリングはポリクローナル抗体によるネフェロメトリー、バイオプールはポリクローナル抗体によるELISAである。バイオプールの系では直線性に問題が生じた。

これらの結果はIFCCに報告しているが、まだ各検討施設での結果を含めた討議はなされていない。

4. IFCC Lp(a)WG の合意内容

上述のように現在までのIFCC Lp(a)WG 合意事項をまとめた。

- ① Phase I で8候補品全般のデータ比較を実施した。
- ② Phase II では4種に絞られたPRMの具体的な性能評価比較を実施した。そしてその中からPRM-2 B (Behring 社) を最終的にPRMとして選択した。
- ③ Phase III では Primary Reference Material からPRM-2 B への値付けと国際 Harmonization を目指すこととしている。

今後1年以内に検討を終了し、WGとしての結論をIFCCから最終的にはWHOに答申していくものと考えられる。

標準化による臨床評価への影響

Lp(a)は国内では1993年10月に健康保険の適用を受けて以来、これまでに多くの臨床場で測定され、虚血性心疾患やさまざまな疾患との関連性が評価されてきた。

しかし測定方法・試薬の多様化が先行したために、各測定キット間でのcommutabilityが十分に確認されていないままデータが蓄積されてきたのが現状である。

標準物質・測定方法・使用機器の互換性などの多くの面で標準化がされるとともに、Lp(a)の臨床的な測

図5. Primary standard 候補品を用いた PRM への値付け。

定意義が再評価されるべきであるとの意見も高まりつつある。

今回の IFCC の標準化作業で Lp(a) Primary Standard, PRM が設定され、濃度は mole で表現される方向となった。しかし現在国内では各試薬ごとに値付けがされており、全てのキットがリポ蛋白の重量濃度 mg/dl で表現されている。IFCC 標準化によって生じる影響について以下に述べてみた。

1. PRM とキャリブレーションの問題

アドホック Lp(a) 標準小委員会が実施した国内サーベイの結果では、国内で販売されている試薬ごとの検体における相関性は良好であった。しかし、キャリブレーターと試薬は同一キットの組み合わせで使用しなければならず、他の試薬と共用できるキャリブレーターはない。

今回の IFCC Lp(a) WG で選択された PRM は、ヒト血清ベースで調整されたものであり、おそらく国内の各試薬に適用しても試薬間差は生じないことと予想される。しかし、絶対値はこれまでの国内 Lp(a) 値と差異が確認されており、この点では検討が必要となってくるであろう。また、標準化システムの中で PRM は二次標準血清の位置づけであり、実際にルチンワークで用いられることは少なく、各試薬を販売する企業においてキャリブレーターに値付けする際の基準となることが予測される。したがって、各企業におけるキャリブレーターはヒト血清ベースで調整されたものとなることが望ましいと考える。

2. mole 表現の影響

Lp(a) には phenotype が存在し、Kringel 構造 (Kringel IV) の繰り返しが最大 37 個まで存在することから、mole で表現した場合にはリポ蛋白の重量で捉えた場合に比較して最大 1.5 倍もの差が生じることとなる。

我々のデータ (図 6, 7) によれば、日本人の Lp(a) phenotype は Utermann らの旧分類で表現すると S4 タイプが最も多いことがわかっているが、S4 タイプは S1 タイプの 1.2 倍ほど分子量的に差があるわけであり、リポ蛋白濃度で表現した場合と mole 表現した場合とでは数値の持つ意味は大きく変わってくることになる。また、国際的に phenotype は、Utermann らの旧分類から Kringel IV 数で表現する方向になりつつあり、この表現で示せば同様に Kringel IV 35 と Kringel IV 21 では約 1.2 倍の数値の差が生じることとなる。

表 2 は Lp(a) phenotype を Kringel IV 数で表示した場合と国内で主に用いられている旧 Utermann 分類で表示した場合とを対比させたものである。

国内では ApoB-100 の異動度を基準にして、これより異動度の早いものを F、遅いものを順に S1 から S4 までと表現しているが、Immuno 社の標準に比較すると B タイプでも異動度が異なってしまっている。Immuno 社の Lp(a) phenotype 標準血清は Kringel IV 数に応じた Utermann 表現をも対比させているが、表に示したように我々の施設あるいは国内市販品の表

図 6. 日本人の phenotype 頻度。

図7 mole 表現した際の Lp(a) ヒストグラム.

表2. Kringle IV数と Utermann 分類の対比表.

Number of Kringle IV repeats	Nomenclature according to Utermann	Nomenclature according to Sanwa	Nomenclature according to SRL
35	>S 4	S 4	S 4
27	S 4	S 2	S 2
23	S 3	S 1	S 1
19	S 1	B	B
14	B		

示との間にズレが生じている。すなわち、旧 Utermann 分類から Kringle IV数への単純変換時には注意が必要である。

このようなことから、もしも過去の測定値を mole 表示とする場合には、用いた試薬、抗体の反応性と検体の phenotype によって異なり、抗体の各 phenotype への反応性の違いのほかに、試料の phenotype がシングルバンドかダブルバンドかによって mg/dl から mole への変換も異なってくることになる。

まとめ

Lp(a)測定標準化について、IFCC Lp(a)WG の標準化活動を中心に述べた。現在までに標準物質や Reference Material の設定がされ、表現方法も重量表示から mole 表示に変更する提起がされている。

基本的に標準化はデータの統一化というのが期待できるのだが、Reference Material の各試薬への適用や Lp(a)測定値をこれまでの重量濃度から新たに mole 濃度表示に変えることによって生じる混乱は避けられないことであろう。標準化は合意であり、決定

された事項について皆ができる限りこれに適するよう努力することもまた必要なことと考える。Lp(a)には phenotype が存在しており、Lp(a)の作用機序を分子として捉えたとするならば、mole 表示とすることも望ましいとも考えられる。

そして今までの臨床的評価に加えて、mole レベルでのデータ蓄積がされることによって、新たな評価が得られる可能性を持っており、標準化以降の今後の臨床的検討に期待したい。

文 献

- 1) Berg K. A new serum type system in man—The Lp system. Acta Pathol Microbiol Scand 1963; 59: 369-82.
- 2) Mclean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. Nature 1987; 300: 132-7.
- 3) Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. Atherosclerosis 1981; 38: 51-61.
- 4) Scanu AM. Lipoprotein(a). A genetic risk for premature coronary heart disease. J Am Med Assoc 1992; 267: 3326-9.
- 5) 国際標準委員会報告 国際化学連合 (IFCC) Working Group Lp(a). 臨床病理 1996; 44: 297-8.
- 6) 櫻林郁之介, 細萱茂実, 亀子光明, 高橋 修, 久保野勝男, 太田拔徳, 山下寿美子, 五十嵐富三男, 戸塚実, 藤田誠一, 真鍋満久, 清水喜久男, 重松 貴, 山田晋吾, 高橋良夫, 金子隆司, 久保信彦, 片山善章, 安部 彰, 野間昭夫, 河合 忠. 日本臨床病理学会

標準委員会・アドホック Lp(a)標準小委員会報告 II. 標準物質統一によるキット間差是正の試みに関するサーベイ. 臨床病理 1996; 44: 292-6.

- 7) 久保野勝男. 免疫化学的検査における試薬間誤差の現状と問題点—Lp(a)—. 臨床化学 1994; 23(補): 23-7.

要 旨

Lipoprotein(a) [Lp(a)] 測定に関する標準化については, IFCC の Lp(a)標準化に関するワーキンググループ (IFCC Working Group on Lp(a)) や日本臨床病理学会標準化委員会のアドホック Lp(a)標準小委員会が活動を行っている. 現在までに IFCC Lp(a)

WG では, 8 種の Proposed Reference Material 候補品全般の各種性能評価比較を実施し, その中から PRM-2 B (Behring 社) を最終的な PRM として選択した. さらに今後は Primary Reference Material から PRM-2 B への値付けと重量表示から mole 表示への変更を含めた国際的 Harmonization を目指すこととしている. 今後 1 年以内に検討を終了し, WG としての結論を IFCC から最終的には WHO に答申していくものと考えられる. 今までの臨床的評価に加えて, mole レベルでのデータ蓄積がされることによって, 新たな評価が得られる可能性を持っており, 標準化以降の今後の臨床的検討に期待したい.