

血色素変性固定法を用いた高コレステロール血症のマス・スクリーニング法（試案）

藤村 有信，金田 誠一，川村 正彦*
（名古屋市衛生研究所，*名城病院小児科）

研究目的

生体のコレステロールは胆汁酸やステロイドホルモンの前駆体として重要な働きをし、血清コレステロールの70%は脂肪酸と結合したエステル型、残りの30%が遊離型となっていて、これを総称して、総コレステロールと呼ぶ。これらは蛋白と結合し、水溶性リポ蛋白となっている。高コレステロール血症は重大な成人病であるが、これを新生児より早期に発見して、治療してゆくことはこれからの大きな課題であるが、マス・スクリーニング化はこれまで浅見らの方法とアポB法以外あまりない。浅見らの方法も血液ディスク5mm径2個を使い、抽出に一夜かけ、蒸発乾固後も測定に非常に時間がかかる難点があるので、マス・スクリーニング化は難しい。我々はdisc 3mm径1個を使って、血色素の変性と抽出とを短時間（1時間内）に行ない、マイクロプレート用迅速プレートリーダーを用いて短時間にコレステロールを定量する新しいマス・スクリーニング法を考案し実用化を検討したので報告する。

研究方法

総コレステロール測定法：Sterozyme 545（酵素法），富士レビオ製キット

原理：コレステロール \longrightarrow コレステロール+脂肪酸
エステル （コレステロールエステラーゼ）

コレステロール \longrightarrow Δ -コレステノール+H₂O₂
（コレステロールオキシダーゼ）
（パーオキシターゼ）

4-アミノアンチピリン+N,N-ジエチルアミノm-トルイジン+H₂O₂ \longrightarrow
赤紫色キノイミン色素+4H₂O…色素を550nmで測定する。

反応：キットの酵素液をマイクロプレートに300 μ l加える前に標準液10, 20, 30, 40, 60, 90mg/dl各10 μ lと血液ディスク3mm径1個（血色素変性と抽出処理）を入れ、5分反応して、その150 μ lを別のプレートに移し、コロナMTP32の吸光光度計で測定する。

研究結果

1. コレステロールの検量線

反応液150 μ lを使って、定量する場合のコレステロール濃度mg/dl(Y)とA550nm(X)は直線を示しY=2,500X, 反応液300 μ lの場合はY=1,250Xとなる。

血清1~1.5 μ lはヘマトクリット値50%として、血液濾紙ディスク3mm径1個即ち血液として

約 $3\sim 3\mu\text{l}$ に相当する。使用した血液容量に相当する標準コレステロール容量の検量線を用いてディスク中のコレステロール値を計算する。

2. 測定波長の選択

二波長として、 550 nm と他方 492 nm 、 415 nm 、 630 nm にて測定した。又一波長の 550 nm でも検討したところ、 550 nm のみの一波長がもっとも吸光度が高く、二波長 $550\text{ nm}/492\text{ nm}$ がもっとも吸光度が低かった。

3. 血色素変性処理とコレステロール抽出の検討

クロロホルム：メタノール（ $2:1$ ）は抽出に一夜必要のため、もっと短時間例へば1時間内に血色素変性とコレステロール抽出出来る系を検討した。血色素変性固定用に開発した系の内最も良好なのはE系であった。さらに検討する内にⅢ系とⅣ系とがそれより抽出が高いことを知った。溶媒の中には反応液と結合して呈色するものもあるので、注意が必要である。

以上の系は 37°C 、 $30\text{分}\sim 60\text{分}$ で終了出来るので、従来法にくらべ大変簡便で迅速化出来た。

4. 添加および希釈試験

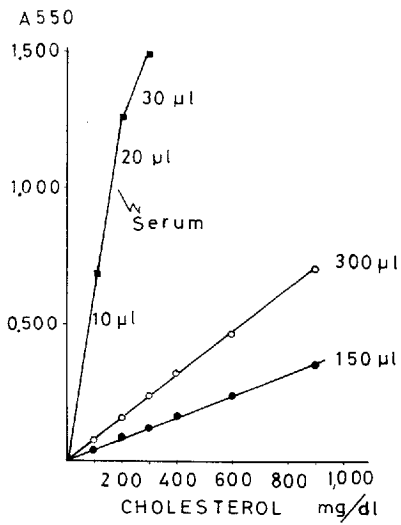
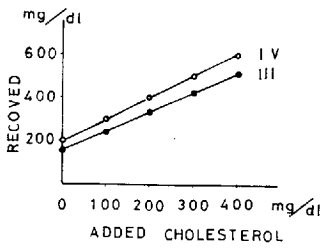
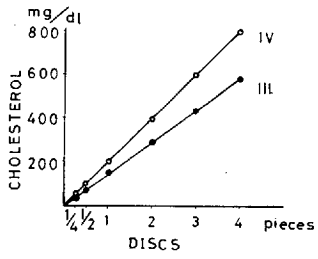
約 200 mg/dl のコレステロールを含む血液ディスク 3 mm 径 4 、 3 、 2 、 1 、 $\frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$ 個で抽出液ⅣとⅢ系を使って検討したところ、どちらも 0 を通る直線となった。この場合Ⅳの抽出液の方がⅢより高いことが図より明らかである。

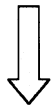
5. 添加の回収試験

コレステロール 200 mg/dl を含む血液濾紙ディスク1個に 100 、 200 、 300 、 400 mg/dl を添加し、その回収率を見たところ、ⅣとⅢ系ともにほぼ 100% 回収測定されていた。

考 察

従来法は抽出時間と蒸留乾固で二日以上を必要とし、さらに測定に相当時間がかかっていたのでマス・スクリーニング化は実際上は困難であった。我々は血色素の変性と抽出を $30\sim 60$ 分で完了して、測定にマイクロプレート用迅速吸光度計を用いる新しいコレステロール血症のマス・スクリーニング法を考案した。 300 件のすべての処理時間は2時間程度ですますことが出来る。今後なお抽出法の検討や症例についての従来法との比較検討又はHDLコレステロールやトリグリセライド測定に応用してゆきたい。





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



研究目的

生体のコレステロールは胆汁酸やステロイドホルモンの前駆体として重要な働きをし、血清コレステロールの70%は脂肪酸と結合したエステル型、残りの30%が遊離型となっていて、これを総称して、総コレステロールと呼ぶ。これらは蛋白と結合し、水溶性リポ蛋白となっている。高コレステロール血症は重大な成人病であるが、これを新生児より早期に発見して、治療してゆくことはこれからの大きな課題であるが、マス・スクリーニング化はこれまで浅見らの方法とアポB法以外あまりない。浅見らの方法も血液ディスク5mm径2個を使い、抽出に一夜かけ・蒸発乾固後も測定に非常に時間がかかる難点があるので、マス・スクリーニング化は難しい。我々はdisc3mm径1個を使って、血色素の変性と抽出とを短時間(1時間内)に行ない、マイクロプレート用迅速プレートリーダーを用いて短時間にコレステロールを定量する新しいマス・スクリーニング法を考案し実用化を検討したので報告する。