

## 抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたELISA法による ウィルソン病マススクリーニング法の基礎的検討

冷牟田修一<sup>1,2</sup>, 清水敬子<sup>1,2</sup>, 門田明彦<sup>1</sup>, 青木継稔<sup>2</sup>

要約：抗活性型セルロプラスミン（CP）抗体を用いた活性型CPの測定によるウィルソン病マススクリーニング法について基礎的検討（1. 測定法の精度 2. 濾紙血スタンダードの作製）を行った。精度に関しては、ウェル間、プレート間のバラツキも少なく（C.V.%<5）、感度、特異性、同時再現性ともに良好な値を示していた。また、今回作製した濾紙血スタンダードは①実測値との差も少なく、②溶液スタンダードとの相関も良く、③作製したスタンダード間のバラツキも低い（C.V.%<10）性能の良いものであった。

見出し語：マススクリーニング、ウィルソン病、活性型セルロプラスミン

目的：ウィルソン病は出生約3～3.5万人に1人といわれ、現在わが国において実施されているフェニルケトン尿症マススクリーニングによる発症頻度の2～2.5倍と多い。また、本症は、D-ペニシラミン等の銅キレート剤の経口投与により発症予防、或いは、治療可能な数少ない先天代謝異常症の1つである。ウィルソン病は血清CP値の低下及び肝への銅蓄積を特徴としているが<sup>1)</sup>、近年、血清CP値の低下はCP蛋白の減少の

みでなく不活性型CPの発現およびCP活性の低下に起因するといわれてきた。我々は活性型CPのみを測定する方法を用い、ウィルソン病患者及び健常新生児血中活性型CPの測定を行い、ウィルソン病患者血中で活性型CPの著しい減少を認め昨年報告した。本年はこの測定法の精度及びこの測定に用いる濾紙血スタンダードの作製を検討した。

方法：測定法の精度は同一濾紙血サンプルを用い、3枚のプレートで1

---

1. 出光興産中央研究所, 2. 東邦大学医学部

表 1. 測定原理

測定法	サンドイッチエライザ
下部抗体	ID1抗体 (ポリクローナルでも可)
上部抗体	ID2抗体 (活性部位認識抗体)
発色剤	ABTS (OPDでも可)
測定限界	5x10 <sup>-4</sup> mg/dl

表 2. 濾紙血スタンダードの作製法

- ↓新鮮ヒト全血中セルロプラスミン値を測定 (ヘキスト社製スタンダード)
- ↓セルロプラスミン (ヘキスト社製) を全血或いは血球懸濁液に添加し調整 (ヘマトクリット値5%)  
血清中濃度 0、 5、 10、 15、 20、 25、 35mg/dl  
(全血中濃度) (0)(2.25) (4.5) (6.75) (9) (11.25)(15.75)
- ↓濾紙にスポット
- ↓風乾
- ↓濾紙血中セルロプラスミン濃度を測定 (血清値で表示)
- ↓乾燥剤と共に保存

表 3. 測定法の精度に関して

①感度 (吸光度) 試験成績  
ウェル間 (n=5)

血清濃度 (mg/dl)	10	16	20
MEAN	0.493	0.685	0.876
S.D.	0.019	0.013	0.034
C.V.(%)	3.936	1.932	3.900

プレート間 (n=3)

血清濃度 (mg/dl)	10	16	20
MEAN	0.499	0.687	0.886
S.D.	0.008	0.011	0.025
C.V.(%)	1.612	3.695	2.878

②特異性 (測定値) 試験成績  
プレート間 (n=3)

血清濃度 (mg/dl)	10	16	20
MEAN	10.21	15.55	20.46
S.D.	0.018	0.197	0.075
C.V.(%)	0.468	1.269	0.366

プレート 5 重の測定により実施した。用いたサンプルの CP 濃度は 10, 16, 20mg/dl の 3 点を使用した。測定法は昨年報告した方法 (表 1) によった<sup>2)</sup>。

濾紙血スタンダードは表 2 に示した方法に従い作製した。作製した濾紙血スタンダードを用いて検量線を作製し、更に濾紙血スタンダードの表示値と実測値の違いを溶液スタンダードを用いて測定、比較した。また現在まで測定を実施してきた溶液スタンダードによる測定値と濾紙血スタンダードによる測定値の比較を同一検体 (n=25) を用いて行った。最後に濾紙血スタンダードの精度につき同一スポット内、及びスポット間のバラツキをみた。

結果と考察；測定法の感度、特異性はともに良好な値を示していた。感度から求めた各濃度におけるプレート間、プレート内の C.V. 値は 5% 以下であった。また、測定値から求めた各濃度のプレート間の C.V. 値も 1% 前後と非常に良好であった (表 3)。作製した濾紙血スタンダードによる検量線は、0~35mg/dl (血清中の CP 濃度で表示)迄、溶液スタンダードと同様直線性を示した。表示値と

図 1. 各スタンダードによる  
測定値の比較

濾紙血スタンダードによる測定値 血清スタンダードによる測定値  
MEAN ± S.D. 14.94 ± 2.74 (mg/dl) MEAN ± S.D. 15.18 ± 3.70 (mg/dl)

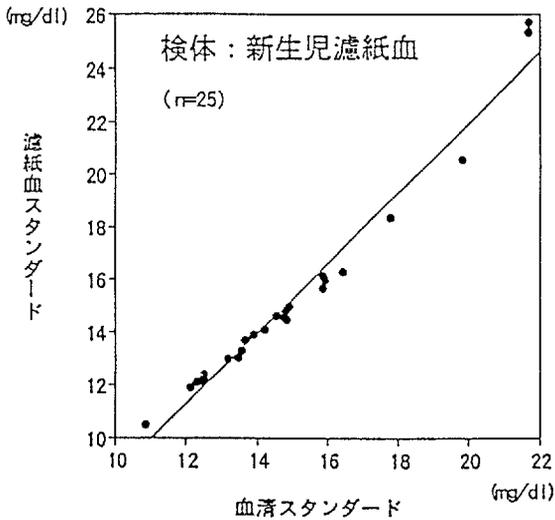


表 4. 濾紙血スタンダードの  
同時再現性

スポット内 (n=4)

表示値 (mg/dl)	5	10	15	20	25	35
MEAN	5.75	10.01	14.50	18.61	25.05	35.16
S.D.	0.22	0.33	0.72	0.15	1.14	1.24
C.V.(%)	3.19	3.27	5.00	0.83	4.36	3.53

スポット間 (n=5)

表示値 (mg/dl)	5	10	15	20	25	35
MEAN	5.84	9.42	14.82	19.84	25.04	35.22
S.D.	0.35	0.55	1.17	0.74	2.00	2.76
C.V.(%)	5.54	5.89	7.91	3.75	7.98	7.84

濾紙血スタンダード、溶液スタンダードともに平均値は15 mg/dl付近であり両者の相関も非常に良好であった(図1)。作製した濾紙血スタンダードのバラツキについても同一スポット内のC.V.値が5%以内、スポット間のC.V.値でも8%以内とバラツキは少ない事が分かった(表4)。以上の結果、本測定法及び濾紙血スタンダードともに精度は高く、マスキングに使用し得る信頼性の高いものであることが示唆された。

文献

- 1) Scheinberg I. and Sternlieb I : Wilson's disease, WB Saunders, 1984
- 2) Hiyamuta S., Shimizu K. and Aoki T. Lancet, 1993 319, 342, 56-57

実測値の相関も非常に良好であった  
(相関係数 R = 0.998)。



## 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



要約:抗活性型セルロプラスミン(CP)抗体を用いた活性型CPの測定によるウィルソン病マ  
スクリーニング法について基礎的検討(1.測定法の精度 2.濾紙血スタンダードの作製)  
を行った。精度に関しては、ウェル間、プレート間のバラツキも少なく(C.V.%<5)、感度、  
特異性、同時再現性ともに良好な値を示していた。また、今回作製した濾紙血スタンダー  
ドは 実測値との差も少なく、 溶液スタンダードとの相関も良く、 作製したスタンダ  
ード間のバラツキも低い(C.V.%<10)性能の良いものであった。