

新生児スクリーニングで発見された高コレステロール血症児のその後  
(分担研究：今後開発すべきスクリーニング種目の検討)

太田孝男, 松田一郎

要約：乾燥血液口紙中のアポBを測定することで、2500名の新生児高コレステロール血症スクリーニングを行った。13名の高コレステロール血症児を発見し、そのうち3名は2才時点でのコレステロール及びアポB値より、家族性高コレステロール血症(ヘテロ型)である事がわかった。他の2名については高アポB血症児である事が示唆された。従って、私達の開発したスクリーニング法が有効である事が確認された。

見出し語：ELISA, アポB, 高コレステロール血症

はじめに：冠動脈硬化症は成人病として扱われているが、実際には、その病変は小児期よりすでに始まっており、徐々に進行して中高年になって初めてその症状が現れてくる。従って、早期にその危険因子を発見し、その進行を予防する事が重要である。私達は今回、乾燥血液口紙(DBS)を用いた、高コレステロール血症のスクリーニングで発見された異常児の2才の時点でのリポ蛋白及び脂質について検討したので報告する。

方法：

1. アポBの精製

アポBは低比重リポ蛋白(LDL)の蛋白98%を占める事から、LDLを精製することでアポBを得た。LDLはHavelらの方法に従い、正常ヒト血清より超遠心で分離した。このLDLはアポEを含んでいるため、McConathyらの方法でConA-Sepharoseカラムを用い、アポEを除き、アポBだけからなるLDLを得た。

2. ペルオキシダーゼ標識抗アポBウサギIgG-Fabの作成

1で得られたアポBでウサギを免疫し、抗血清を得た。この抗血清から affinity chromatography を用いて抗アポBウサギIgGを精製した。アフィニティカラムとして、CNBr activated Sepharose 4Bを用い、膨潤ゲル 1ml当たり 1mgのアポBを Cuatrecasasの方法でカップリングさせた。溶出には 0.2Mグリシン塩酸 pH2.2を使用した。以上の操作で得られた、抗ヒトアポBウサギIgGはペプシンで処理し F(ab)<sup>2</sup>にさらにメルカプトエチルアミンと反応させ、Fabとした。このFabを、石川等の方法に従い、ペルオキシダーゼで標識した。

### 3. ELISA (2抗体サンドイッチ法)

アポBの定量は2抗体サンドイッチ法で行った。

#### ①抗アポB抗体(IgG)の固相への吸着

96wellのマイクロタイタープレートを使用し、0.1M炭酸塩バッファー pH 8.5で10 $\mu$ g/mlに調整した抗アポB IgGをトレイの各wellに100 $\mu$ l入れ、4 $^{\circ}$ C、一晩放置して固相へ吸着させる。

②各wellを吸引して除き、洗浄液(0.15M NaCl, pH7.5)で3回洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)溶液(0.01M Na-PB, 0.15M NaCl, pH7.5)250 $\mu$ lを各wellへ入れ、37 $^{\circ}$ C、3時間インキュベーションし、抗体が吸着していない固相表面をおおう。

③各wellの液を吸引・除去後、洗浄液で各wellを3回洗浄し、被検体100

$\mu$ lを入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩静かに攪はんする。

④各wellの液を吸引除去後、well内を4回洗浄し、方法2で得られたペルオキシダーゼ標識抗アポB Fab 100 $\mu$ l (1 $\mu$ g/ml, 0.01M Na-PB, 0.15M NaCl, 20%正常ウサギ血清 pH7.4)を各wellへ入れ、37 $^{\circ}$ C、3時間インキュベーションする。

⑤各wellの液を吸引除去後4回洗浄後、酵素基質溶液 100 $\mu$ l (ABTS, Aymed社)を各wellへ入れ、室温30分後、2mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 溶液を各wellへ入れ、反応を停止させる。この後、405nmフィルターで吸光度を測定する (EIA Reader, Model EL307, BIO-TEC社)

#### 4. DBSからのアポBの抽出

3mm径のDBSを用い、200 $\mu$ lの抽出液(0.01M Na-PB, 0.15M NaCl, pH7.3あるいは、0.01M Na-PB, 9.15M NaCl, 0.1% TritonX-100, pH7.3)で4 $^{\circ}$ C一晩放置し、抽出した。抽出液はさらに100倍、0.01M Na-PB, 0.15 M NaCl, pH7.3溶液を使って希釈し、ELISAプレートwellに加えた。なお血清中のアポB測定は8万倍に0.01m Na-PB溶液で希釈して行った。

上述の方法を用い、2500名の新生児スクリーニングを行い、13名の高コレステロール血症を示す新生児を発見した。今回は、このうち協力の得られた10名について、2才時点で総コレステロール、HDL-コレステロール、アポBを測定した。

結果：表1に示すように5ヵ月時に総コレステロール値が200mg/dlを越えていた5名のうち3名は初めの予想どおり、ヘテロのFHらしく、2才時のコレステロール値は280~350mg/dlを呈していた。アポリポ蛋白Bの値も非常に高値を示していた。Case 5は、2才時には総コレステロール197mg/dlと高値を示したが、HDL-コレステロールが5ヵ月と同様非常に高値93mg/dlを示し、高 $\alpha$ -リポ蛋白血症と考えられた。残りの1名は2才時に総コレステロールは160mg/dlと正常域にあるが、アポBレベルが高値を続けており、最近報告された、高脂血症で高アポB血症を伴っている症例に属するものと考えられた。アポリポ蛋白についてはアポB以外、特徴ある所見は得られなかった。他の例ではCase 9で、2才時でのアポBが90mg/dlとやや高値を

示していたが、Case 3と同様の例であるのかどうかは、現在不明である。残りの4例は全て正常域にあった。

結論：高コレステロール血症は動脈硬化の主要危険因子の一つであり、その頻度は家族性高コレステロール血症だけでも、0.2%といわれている。動脈硬化が長い年月をかけて進行していく疾患である事を考えるとき、できるだけ早期に危険因子を発見し、除去することは予防のために非常に重要であると思われる。もし新生児期に高コレステロール値をコントロールできれば、大人になってからの動脈硬化をかなり減少させることが可能であろう。その発見の方法として私達の開発したアポBに対するELISAは先に述べた結果から見て非常に有効な方法と思われる。

表1 Plasma lipid levels in 10 children at 5 and at 24 month old.

		total cholesterol, apoB			triglyceride		HDL-cholesterol	
		5M	24M	24M	5M	24M	5M	24M
1	N. S	277	320	136	107	75	36	45
2	M. H	252	350	148	103	65	45	40
3	M. M	219	160	102	195	103	37	35
4	I. Y	217	280	120	94	90	40	45
5	K. K	211	197	93	75	52	75	93
6	K. Y	196	152	90	132	87	47	46
7	K. Z	187	157	70	150	124	50	44
8	M. S	176	123	63	173	175	51	43
9	I. M	174	173	134	97	57	45	49
10	A. Y	173	150	73	87	73	33	48
11	control	120 $\pm$ 24	156 $\pm$ 23	65 $\pm$ 15	65 $\pm$ 30	70 $\pm$ 25		

values are expressed in mg/dl.



## 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:乾燥血液口紙中のアポ B を測定することで、2500 名の新生児高コレステロール血症スクリーニングを行った。13 名の高コレステロール血症児を発見し、そのうち 3 名は 2 才晦点でのコレステロール及びアポ B 値より、家族性高コレステロール血症(ヘテロ型)である事がわかった。他の 2 名については高アポ B 血症児である事が示唆された。従って、私達の開発したスクリーニング法が有効である事が確認された。