

1歳6ヶ月健診時における原発性高コレステロール血症のスクリーニングについて
(分担研究:マス・スクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢に関する研究)

太田孝男, 中村倫恵, 松田一郎

要約 動脈硬化性心疾患の早期予防を目指し、私達はその危険因子である高コレステロール及び低HDL血症のスクリーニングを1歳6ヶ月健診時に試みた。代謝異常スクリーニング用の濾紙を用い耳だ採血し、アポB及びアポA-Iを免疫拡散法で測定した。これまで約600名のスクリーニングを行い、1名の高コレステロール血症児、3名の低HDL血症児を発見している。この時期にスクリーニングを行う事は、治療(食事療法)を直ちに開始出来ること等より、非常に有効であると思われた。

見出し語：高コレステロール血症，低HDL血症，動脈硬化性心疾患

研究方法

1) 抗血清の作製

詳細は他誌に報告¹⁾しているのでここでは簡単に述べる。

正常人の血清より超遠心にてHDLを分離し、0.01% EDTA, PH 7.0にて透析後、凍結乾燥させた。これを Kostnerらの方法²⁾により脱脂し、Sephadex G-100 と DEAE ion-exchange chromatography を用いて Apo A-I を分離した。

Apo B は同様に超遠心にて LDL を分離し、ConA Sepharose 4Bカラムに通し、0.2mol/l methyl α -D-glucoside, 0.02

mol/l Tris-HCl, pH7.2で溶出して、Apo Bのみで他のアポ蛋白を含まないLDLを得た。

これらのApo A-I とLDLとをそれぞれ NZWウサギに皮下注射し、抗血清を得た。

2) アポ蛋白の測定

i) 乾燥濾紙血からの測定

被検者の耳朶から2~3滴採血して濾紙(新生児先天代謝異常症マススクリーニング用濾紙)に吸収させ、一昼夜放置して乾燥させた。その乾燥濾紙血から直径3mmの円を6枚切り取り、抽出液(10 mmol/l Sodium phosphate buffer, pH

7.4, 0.9% NaCl, 0.5% detergent:
TericG12A12)に浸し室温で24時間おいた。

抗血清を含むアガロースプレートを作製するために、1% agarose, 50mmol/l sodium barbitone buffer, pH8.8, 10 mol/l EDTAをオーロクレーブで10分間加熱してアガロースを溶かし、ゆっくりと恒温層の中で冷やして液が56℃になったところで抗血清を加え(抗Apo A-I抗血清は5%, 抗Apo B抗血清は0.5%)、直ちに厚さ1.5mmのスペーサーをはさんだ2枚のガラス板の間に流して室温に約20分間放置して固めた。このアガロースプレートに検体用の穴をあけ(Apo A-I測定プレートは直径3mm, Apo B測定プレートは直径4mm)、抽出の終わったサンプル液をいれた(Apo A-I測定プレートには5 μ l, Apo B測定プレートには20 μ l: 1回10 μ lをいれ、浸透するのを待ってからもう一度10 μ l入れる)。このプレートを湿度100%、室温にて48時間放置した。その後プレートを生食で洗浄後乾燥させ、染色液(2.5% Coomassie Brilliant Blue-R)で染色し、沈降輪の大きさを測定した。アポ蛋白濃度を標準曲線より算出した。

ii) 血清からの測定

被検者の静脈より約1ml採血し、2500 rpmで20分間遠心して血清を分離した。これを2つに分け、Apo A-I測定用には上記の抽出液で15倍に希釈し、Apo A-I測定プレートに5 μ l入れて沈降輪の大きさを測定した。同様にApo B測定用には5倍希釈し、Apo B測定プレートに10 μ l入れて沈降輪の大きさを測定した。標準

曲線をもとにアポ蛋白濃度を算出した。

3) 標準曲線

標準血清(QS血清;ヘキストジャパン)を用いた。Apo A-I測定用には10倍, 15倍, 20倍, 25倍, 30倍の希釈系列(抽出液で希釈)をつくり、上記のApo A-I測定プレートに5 μ lずつ入れ、その沈降輪の直径を測定し、15倍希釈の標準血清のApo A-Iの濃度を100Uとして沈降輪の直径の2乗を縦軸に、Apo A-Iの濃度(U)を横軸にして、標準曲線を作製した。同様にApo B測定用には4倍, 6倍, 8倍, 12倍, 16倍の希釈系列(脱イオン水で希釈)をつくり、Apo B測定用プレートに10 μ lずつ入れ沈降輪の直径を測定、5倍希釈を100Uとして標準曲線を作製した。

結果

アポA-I, アポB共に50~250uの範囲で標準曲線は直線性を示した。乾燥血液濾紙中のアポA-I, アポB濃度は4℃で保存すれば、2週間までその値に変化はみられなかった。血清と乾燥濾紙血のアポA-I及びアポBは非常に良好な相関を示し、その相関係数はアポA-Iで0.9, アポBで0.96であった。また動脈硬化指数アポB/アポA-I比では0.91であった。これまで熊本市内の5つの保健所並びに保健センターの協力を得て630名の1歳6ヶ月児のスクリーニングを終了した。その結果アポA-I, アポB及びアポA-I/アポB比の平均値 \pm SDは、それぞれ88.5 \pm 14.2, 111.2 \pm 0.24, 1.28 \pm 0.24であった。アポA-Iでは-2.5SD以下、アポB, アポA-I/アポ

B比では +2.5SD以上を要再検者として呼び出し、両親・兄弟を含めて血液検査を行った。これまで6名を再検査し、1名の家族性高コレステロール血症児、3名の低HDL血症児を発見し、治療を開始している。

考 察

高脂血症をスクリーニングする方法は今までもいくつか提案されている。新生児の臍帯血の総コレステロールを測定する方法⁹⁾やLDLコレステロールを測定する方法⁹⁾は3年間の追跡調査の結果、偽陽性や偽陰性が多く、効果的ではなかったとの報告がある⁹⁾。これは出生後の血中脂質が急激に変動していくことと関係していると考えられる⁶⁷⁾。

また総コレステロールのみを測定する方法⁹⁾は、動脈硬化に対して予防的に働くHDLのコレステロールをも同時に測定してしまっていて、動脈硬化の危険性を検討するためにはこれだけでは不足と考えられる。

Van Biervlietらは出生後血中脂質の安定する生後5~7日⁶⁷⁾の新生児の足底から採血して乾燥濾紙血をつくり、Apo A-IとApo Bとを免疫比濁法にて測定した⁹⁾。しかし、比濁法は技術的な問題、コストの問題があり、スクリーニングに適していないと考えられる。これに対し、Dudmanらは同様に新生児の乾燥濾紙血を用いて、免疫拡散法によりApo Bを測定するという方法を報告した¹⁰⁾。免疫拡散法は手技が簡単で、コストも安くスクリーニングに適していると考えられるが、

Apo Bだけでは血中のリポ蛋白のアンバランスを的確にとらえることができない。Apo Bは正常であるが、動脈硬化の予防因子であるApo A-Iが低いのが特徴である低HDL血症も動脈硬化になりやすいことを考えると、Apo A-Iも同時に測定する必要がある。

今回、われわれが開発したスクリーニング法はDudmanらの方法¹⁰⁾において問題であった点、たとえば濾紙を直接アガロースプレートに入れることが困難であることや、プレートとの反応時間が一週間と長いことなどを改善した方法である。この免疫拡散法を用いて、Apo A-I、Apo Bの両者を同時に測定し、FHのIIa型だけでなく、動脈硬化の危険性の高いリポ蛋白異常者(高LDL血症、高Apo B血症および低HDL血症)をスクリーニングすることができると考えられる。

スクリーニングの時期については、新生児期には先天性代謝異常症のマススクリーニングもあり、同時に採血すれば受診率は高くなると予想されるが、上記したように新生児期には血中リポ蛋白が不安定で変動しやすいこと、ミルクや離乳食の時期に食事療法を開始することは難しいこと、抗高脂血症薬による治療の成長発達への影響がはっきりしていないこと、また家族の心配が強いなどの理由で適当ではないと考えられる。われわれは、血中リポ蛋白が安定しており、食事療法や薬物療法を開始でき、集団採血も行きやすい1歳半か、あるいは3歳時に行うようにするのが良いと考え、現在準備を進めている。

今後は動脈硬化を予防し、虚血性心疾患の発症を止めることが重要になると考えられる。そのためには早期にハイリスク群の患者を発見し、その家族も精査して治療や指導を行う必要がある。このスクリーニング法はこの目的に適した有用なものと考えられた。但し、検体の数が増した場合には EIA の採用が勧められよう¹⁾。

文 献

- 1) Ohta T., Matsuda I.: Lipid and apolipoprotein levels in patients with nephrotic syndrome. *Clin.Chem.Acta.* 117:133-143, 1981
- 2) Kostner G., Alaupovic P.: Studies of composition and structure of plasma lipoproteins. *FEBS LETT* 15:320-324, 1971
- 3) Andresen GE., Lous P., Friis-Hansen B.: Screening for hyperlipoproteinemia in 10000 danish newborns. *Acta Pediatr.Scand.* 68:541-545, 1979
- 4) Boulton TJC., Craig IH., Hill G.: Screening of cord blood low-density-lipoprotein cholesterol in the diagnosis of familial hypercholesterosaemia: A study of 2000 infants. *Acta.Paediatr.Scand.* 68:363-370, 1979
- 5) Kenny D., Ward OC., Mulhern B., Rashied AA.: Failure of cord blood cholesterol and betalipoprotein as screening tests for familial hyperlipoproteinemia. *IJMS* 153:100-105, 1984
- 6) Van Biervliet JP., Vinaimont N., Caster H., Vercaemst R., Rosseneu M.: Plasma apoprotein and lipid patterns in newborns: influence of nutritional factors. *Acta Pediatr.Scand.* 70:851-856, 1981
- 8) 浅見 直, 田中 篤, 郡司哲己, 渡辺繁子, 堺 薫, 若林真理子: 血液濾紙による高コレステロール血症のマス・スクリーニング法. *小児科診療* 47:1229-1233, 1984
- 9) Van Biervliet JP., Vinanimont N., Caster H., Rosseneu M., Belpaire F.: A screening procedure for dyslipoproteinemia in the newborn. Apoprotein quantitation on dried blood spots. *Clin Chem Acta* 120:191-200, 1982
- 10) Dudman NPB., Blades BL., Wilcken DEL., Aitken JM.: Radial immuno-diffusion assay of apolipoprotein B in Blood dried on filter paper . . . a potential screening method for familial type II hypercholesterolaemia. *Clin.Chem.Acta.* 149:117-127, 1985
- 11) Ohta T., Migita M., Yasutake T., Matsuda I.: Enzyme linked immunosolvent assay for apolipoprotein B on dried blood spot derived from newborn infant. *J.Pediatr. Gas.Nutr.* 7:524-531, 1988



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 動脈硬化性心疾患の早期予防を目指し、私達はその危険因子である高コレステロール及び低 HDL 血症のスクリーニングを 1 歳 6 ヶ月健診時に試みた。代謝異常スクリーニング用の炉紙を用い耳だ採血し、アポ B 及びアポ A-1 を免疫拡散法で測定した。これまで約 600 名のスクリーニングを行い、1 名の高コレステロール血症児、3 名の低 HDL 血症児を発見している。この時期にスクリーニングを行う事は、治療(食事療法)を直ちに開始出来ること等より、非常に有効であると思われた。