

## Wilson 病のマス・スクリーニングに関する研究(3)

— ELISA 法による濾紙血中セルロプラスミン

測定法の基礎的検討 —

(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患とその  
実施年令およびスクリーニング法に関する研究)

北川 照男<sup>\*</sup>，大和田 操<sup>\*</sup>，鈴木 健<sup>\*\*</sup>

要約：Wilson 病の早期発見のためのマス・スクリーニングに使用する目的で ELISA 法による濾紙血セルロプラスミン (CP) の測定法を開発したが、検体を冷所に保存しても 3 週後にはその測定値に 20% 前後の劣化が認められたため、検体の保存条件について検討した。本法は、マス・スクリーニングに有用であるが、検体採取、輸送、保存の条件について更に検討し、一定の基準を設定する必要があると考えられた。

見出し語：Wilson 病，濾紙血セルロプラスミン (CP)，ELISA 法

研究目的：我が国でも比較的頻度が高く、薬物療法が可能な先天性代謝性蓄積症 Wilson 病の早期診断を目的として、濾紙血中のセルロプラスミン (以下 CP) を測定する方法につき検討し、昨年、一昨年の本研究班において報告した。そして、ELISA 法による CP 測定がマススクリーニングに有用であると結論したが、CP は比較的不安定な蛋白と云われており、信頼度の高い検査を行うためには、血液濾紙の保存条件による測定値の変化や、測定キットの安定性に関する基礎的な検討が必要と考えられたため、本年度はそれらについて検討した。

方法：濾紙血中 CP の ELISA 法による測定の詳細は、昨年度の本研究班報告書に述べたとおりである。血清 CP 値は、ELISA 法および p-フェニレンジアミンを基質として ferroxidase 活性を比色法により測定する方法 (以下 PPD 法) により測定した。

1) ELISA 法の測定条件に関する検討：本法に使用するペルオキシダーゼ標識 CP 抗原、即ち conjugate と CP 抗体の配合比、conjugate、および抗体の保存条件による変化について検討した。

2) 濾紙血 CP の安定性に関する検討：健常

\* 日本大学医学部小児科 (Dept. of Pediatrics, Nihon Univ. School of Medicine)

\*\* 東京都予防医学協会 (Tokyo Metropolitan Health Service Association)

人から採取した血液を濾紙に滴下して風乾したのちに $+4^{\circ}\text{C}$  および $-40^{\circ}\text{C}$ に保存し、CPを経時的に測定して両者の値を比較した。

3) 血清および濾紙血CP値の比較：血清CPをPPD法およびELISA法によって測定するとともに、同時に採取した濾紙血中CP値と比較した。また、血清および血液濾紙を $+4^{\circ}\text{C}$ と $-40^{\circ}\text{C}$ に保存して、CP値を経時的に測定した。

結果：

1) 試薬の安定性：抗ウサギIgGヤギ抗血清を固相化したプレートは、 $4^{\circ}\text{C}$ に保存した場合、少なくとも3カ月間は使用可能であった。また、ペルオキシダーゼ標識CP抗原(conjugate)は、作成後 $-40^{\circ}\text{C}$ で保存すれば3カ月間は劣化を認めなかった。これに対してCP抗体は原液を $4^{\circ}\text{C}$ に保存し、使用毎に希釈することが必要であった。

2) 濾紙血CP測定値の経時変化：血液採取後室温で乾燥させ、冷蔵庫内( $+4^{\circ}\text{C}$ )と $-40^{\circ}\text{C}$ に、出し入れをせず保存した4検体のCP測定値は図1のようで、いずれの温度で保存しても、3週間後には約20%の劣化が認められた。

3) PPD法により測定した血清CP値の経時変化：血清を200 $\mu\text{l}$ ずつ分注し、冷蔵庫および $-40^{\circ}\text{C}$ に保存して、PPD法により経時的にCP値を測定したところ、図2のように $4^{\circ}\text{C}$ に保存した場合にはferrooxidase活性は速やかに低下した。これに対して $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した場合には、少なくとも2週間はその活性は安定であった。また、血清および同時に採取した濾紙血CPを、PPD法とELISA法で測定した結果は図3のようであり、採取当日の血清CPはPPD法でもELISA法でもほぼ等

図1. 濾紙血4検体中のCP値の経時変化 (ELISA法)

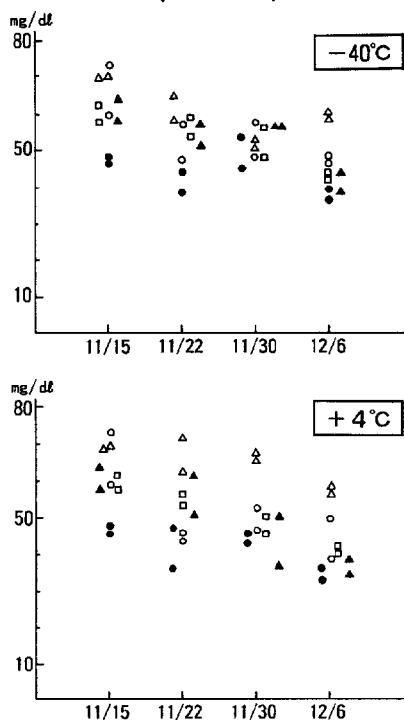


図2. 保存条件による血清CP値の変化 (PPD法)

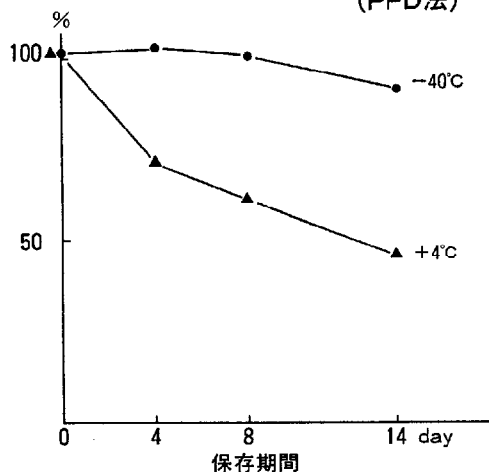
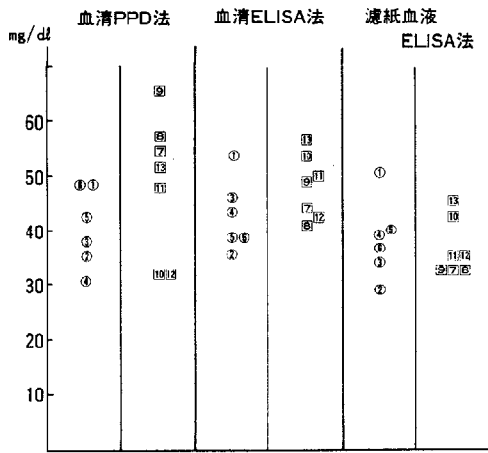


図3. 異なった測定法による同一検体のCP値



①~⑥: 採血当日検査 ⑦~⑬: 2~4ヶ月 -40°C保存後検査

しい値を示し、採取当日の濾紙血CPのELISA法による測定値もほぼ同様な結果を示していた。一方、採取後-40°Cに2~4カ月間保存した場合には、濾紙血の測定値が低い傾向にあった。

考察: Wilson病の早期発見を目的として、我々はこれまで、ELISA法による濾紙血CPの測定を検討し、この方法がマス・スクリーニングに使用可能であることを明らかにするとともに、幼児および学童の濾紙血CP値について昨年、一昨年に本研究班で報告した。しかし、CPは不安定な蛋白と云われており、濾紙血CPの安定性についても検討を要すると考えられたため、本年度はその検討を行った。

その結果、-40°Cに保存しておいても、数カ月後には、採取直後の測定値に比べ20%前後の低下を示すことが明らかにされた。一方、血清を-40°Cに保存した場合には、その測定値は少なくとも3週間は変化せず、また、図には示さなかったが、1年以上-80°Cで保存した血清CPのPPD法による測定値には殆ん

ど変化を認めていない。従って、濾紙血CPをELISA法で測定した場合の値の変化が、CPの変性によるものなのか、あるいは、長期保存の結果、濾紙からのCPの抽出が悪くなった結果なのかについても検討する必要があると思われる。更に、血液を濾紙に採取し乾燥させ、4°Cあるいは-40°Cに保存する際に、完全に乾燥しないまま冷所に保存した検体では、その測定値は著しく低いことも明らかにされた。

ELISA法による濾紙血CPの測定は、本症の早期診断に有用と考えるが、濾紙の採取、郵送、保存の条件の設定および、ELISA法に使用する抗CP抗体の選択など、更には、昨年すでに報告したように、採血時期の決定、血清CPが正常下限に認められる患者のスクリーニング方法など、検討すべき事項が多くあることも事実である。しかし、本症は治療可能で、しかも比較的頻度が高い疾患であり、その予後を改善するためにもマス・スクリーニングが重要と考えられるので、これからもより良い方法を検討したいと考えている。



## 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:Wilson 病の早期発見のためのマス・スクリーニングに使用する目的で ELISA 法による濾紙血セルロプラスミン(CP)の測定法を開発したが、検体を冷所に保存しても 3 週間にはその測定値に 20%前後の劣化が認められたため、検体の保存条件について検討した。本法は、マス・スクリーニングに有用であるが、検体採取,輸送,保存の条件について更に検討し、一定の基準を設定する必要があると考えられた。