

ELISA法によるWilson病のスクリーニング
—日大方式と東邦大方式の比較—
(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

北川照男* 大和田 操* 鈴木 健**

要約：セルロプラスミンに対するポリクロナール抗体を使用する競合法を用いた日大方式と、セルロプラスミンの活性中心と反応するモノクローナル抗体を使用するサンドイッチ法を用いた東邦大方式とを比較し、後者は前者より測定感度が高く、患者と対照者の識別感度も高いことを明らかにし、Wilson病の新生児マス・スクリーニングの可能性について検討した。

見出し語：セルロプラスミン、モノクローナル抗体、Wilson病、マス・スクリーニング

緒論：治療可能な先天性代謝異常症の代表的な疾患の一つであるWilson病は、わが国でも比較的頻度の高い遺伝性疾患であり、キレート剤で早期治療を行うと肝障害や神経症状の発現を阻止することができるので、その早期診断法の開発が望まれていた。筆者らは、患者の血清中のセルロプラスミン（Ceruloplasmin, CPと略す）の測定によるマス・スクリーニング法を開発して報告してきたが、CPの精製法が進歩してホロセルロプラスミンに対するモノクローナル抗体やCPのactive siteと反応するモノクローナル抗体が作製され、測定の特異性や鋭敏度が著しく向上した。日本大学と東京都予防医学協会とが協力して開発したCPに対するポリクロナール抗体

を使用したELISA競合法と、東邦大学小児科と出光興産中央研究所とが共同で開発したCPのactive siteに反応するモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ法の二法を用いてCPを測定し、夫々の方法の優れた点と問題点を明らかにしたので、若干の考察を加えながらその成績を報告する。

研究対象：Wilson病患者8例、Wilson病以外の慢性疾患で駿河台日大病院小児科を訪れた症例、および健康診断で上記小児科に来院した小児、計69例から採血し、その血清を使用して研究を行った。

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

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

研究方法：

(1) 日大方式によるスクリーニング法

血清中のCPの測定には、抗ウサギIgGヤギ抗血清を固相化したマイクロプレートに、抗ヒトCPウサギIgG血清、ペルオキシダーゼ標識CP抗原、被検血清を入れて25℃で6時間反応させた後に、反応液を除き、プレートを50mM PBS (pH7.4) で3回洗浄する。発色試薬ABTSを加えて室温で30分反応させた後に、0.1% NaNO₂を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（インターメット社）を用いて414 μmの波長で吸光度を測定した。

(2) 東邦大方式と日大方式の比較

東邦大方式の詳細は、別稿に記載されているので本稿では省略するが、日大方式と東邦大方式の要点を比較したのが表1である。

東邦大方式は、CPのモノクローナル抗体によるサンドウィッチ法で、CPの活性中心を測定していると報告されているが、日大方式はCPのポリクローナル抗体を用いた競合法で、活性中心とは無関係にCPを測定する方法である。日大方式では、一次抗体はCappel社製のものを、二次抗体は和光純薬社製のものを用いたが、東邦大方式ではその抗体は出光興産中央研究所が開発したものを使用している。発色試薬は、東邦大方式ではOPDを用いて492 μmの波長で測定し、日大方式では前にも述べたようにABTSで発色して414 μmの波長で測定した。この方法での測定に必要な血清量は、日大方式では1.0 μl、東邦大方式では0.2 μlで、日大方式よりも東邦大方式の方が約5倍も感度が良好であった。

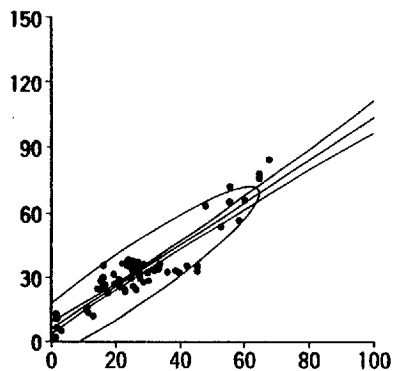
日大・東邦大 二法の比較

区 分	東 邦 大	日 大
原 理	サンドウィッチ法 CP活性中心	競合法 CP
一 次 抗 体	出光興産	Cappel
二 次 抗 体	出光興産 ペルオキシダーゼ標識	和光純薬
標 識 抗 原		CP (シグマ) ペルオキシダーゼ標識
プ レ ー ト	チバコーニング	スミロン # 8496
発 色 試 薬	OPD	ABTS
吸光度測定	λ492nm	λ414nm
サンプル量	0.2μl/1ウェル	1.0μl/1ウェル

研究成績：

同一の血清について日大方式と東邦大方式とでCPを測定した結果、Wilson病8例と健康小児およびWilson病以外の慢性疾患々児69例の測定値は、図1に示すように両方式の測定方法の相関係数は $r = 0.924$ で、両者はよく相関していた。なお、健康小児とWilson病以外の慢性疾患々児69例の測定値の平均は、東邦大方式では $26.66 \pm 15.68 \text{mg/d l}$ 、日大

日大・東邦大 二法の相関



	<X>	<Y>
MEAN	26.660	32.482
S. D.	15.678	16.538
	<N>	<R>
+ 1	77	0.9239951

方式では $32.48 \pm 16.54 \text{mg/dl}$ で、東邦大方式で測定した値よりも日大方式で測定した方が、高値を示すのを認めた。

日大方式と東邦大方式で、上記の77例の血清CPを測定した値のヒストグラムを示したのが、図2である。Wilson病8例とWilson病でない小児69例の測定値の分布は、何れの方法でもはっきりと区別され、これらの方法は本症のスクリーニングに適した方法と思われた。Wilson病以外の小児の測定値のヒストグラムは、2つの方式の何れにおいても、正規分布に近い分布を示した。

次に、8例のWilson病患者の血清CP値を東邦大方式と日大方式で測定した成績を、表2に示す。東邦大方式によって測定したCP値の平均は、 1.6mg/dl であったのに対して、

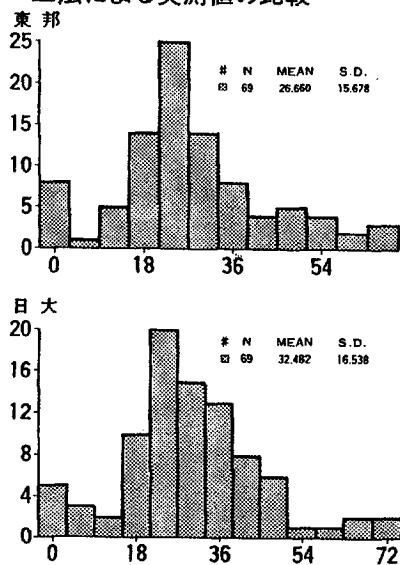
二法による患者濃度の比較

検体	東邦	日大
患者		
1	1.7mg/dl	5.4mg/dl
2	1.2	5.2
3	1.5	5.8
4	1.3	4.9
5	1.4	1.2
6	1.6	3.7
7	2.8	3.4
8	1.4	4.8
患者平均	1.6	4.3
正常者平均	26.7	32.5

日大方式で測定した値の平均値は 4.3mg/dl であり、前者より後の方が約3倍も高値を示すのが認められた。Wilson病でない小児の血清CP値も、日大方式で測定した場合の方が東邦大方式で測定した場合よりも高値を示したが、両群の測定値の差異はそれ程大きくなかったため、患者と正常者の識別は、日大方式よりも東邦大方式の方が優れていると思われた。

日大方式と東邦大方式で使用しているプレートのウエル間の測定値の差異を比較検討したところ、図3に示すように、日大方式で使用しているスミロン#8496のウエル間の測定値の相関係数は、 $\gamma = 0.993$ とウエル間の測定値の差異が少なかったのに対して、東邦大方式で使用しているプレートのウエル間の測定値の相関係数は $\gamma = 0.918$ で、日大方式で使用しているものに比較すると、ウエル間の測定値にやゝ差異があり、使用しているプレートは日大方式で使用しているものの方が、東邦大方式で使用しているものよりも優れていると思われた。

同一検体を用いた日大・東邦大
二法による実測値の比較



考察：

血清CPに対するポリクロナール抗体を使用する競合法でCPを測定する日大方式と、CPの活性中心と反応するモノクローナル抗体を使用するサンドウィッチ法でCPを測定する東邦大方式を比較した結果、東邦大方式の方が日大方式よりも感度が高い上に、患者と対照者の識別感度も前者の方が後者よりも優れていると思われた。しかし、日大方式で使用しているプレートの方が、ウェル間の測定値の差異が少く、東邦大方式で使用しているプレートよりも優れていると思われた。

しかし、何れの方法で測定してもCPを正確に測定できるので、Wilson病のスクリーニングは可能と考えられたが、Wilson病患者の中には比較的高い血清CP値を有する症例もあり、このような症例の発見には測定感度が良好で、患者の識別感度も優れている東邦大方式の方が日大方式よりも有利と考えられる。

もしも、東邦大方式で使用しているCPに対するモノクローナル抗体が十分に供給され得るならば、これを使用してWilson病をスクリーニングすることを真剣に検討すべきであろう。

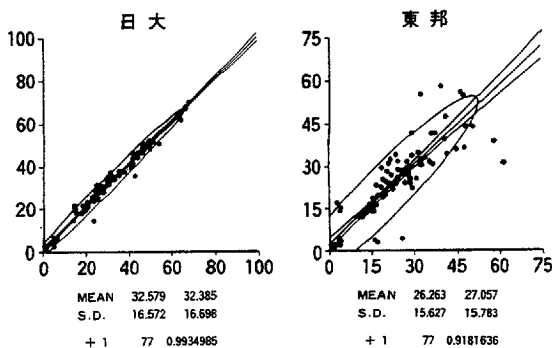
また、正常の新生児の血清CPは著しく低いので、新生児期は患者と正常者の識別が困難で、Wilson病の新生児マス・スクリーニングは不可能とされていた。しかし測定感度が良く、患者と対照者との識別感度も良好な東邦大方式であれば、これが可能と思われる。

前年度の本研究班の報告書に記載したように、日大方式についてはすでに乾燥濾紙血液中のCPの測定が可能であることを証明してあるが、同様な検討が東邦大方式についても必要である。そして、乾燥濾紙血液中のCPが正確に測定できて、新生児血液でもWilson病と対照者の識別が可能であるならば、Wilson病の新生児マス・スクリーニングも具体化されるのではなかろうかと考えている。

文献：

- 1) 大和田 操ほか、我が国における先天性代謝性蓄積症の実態、産婦人科の世界 37:9-15, 1985
- 2) 北川照男ほか、Wilson病のマス・スクリーニングに関する研究(2) ELISA法による濾紙血中セルプラスミン測定法および採血時期の検討 代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング、進行阻止及び長期管理に関する研究(主任研究者黒田泰弘)平成2年度研究報告書。p187-189, 1991

日大・東邦大 二法におけるウェル間差





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:セルロプラスミンに対するポリクロナール抗体を使用する競合法を用いた日大方式と、セルロプラスミンの活性中心と反応するモノクローナル抗体を使用するサンドイッチ法を用いた東邦大方式とを比較し、後者は前者より測定感度が高く、患者と対照者の識別感度も高いことを明らかにし、Wilson 病の新生児マス・スクリーニングの可能性について検討した。