

## 毛細管血、濾紙血検体を用いたホロセルプラスミン値の測定法の開発 その2 血液濾紙からの直接抽出法の開発

(分担研究：マススクリーニング対象疾患に関する研究)

遠藤文夫 中村公俊、粟田久多佳、松田一郎

### <要旨>

我々はこれまでの研究で、抗ホロセルプラスミンモノクローン抗体(CP60)を開発し、これを利用した酵素抗体法によるホロセルプラスミン測定系を開発してきた。この方法は正常人とウイルソン病患者を区別し、ウイルソン病患者を診断するのに優れた方法であることをこれまで示してきた。その一方で、濾紙血液を用いたマススクリーニングへの応用を実施するには、抽出から測定に至る手技を簡略化することが最も重要な課題であった。そこで本年度の研究では、濾紙血検体を用いたホロセルプラスミンの直接測定法を開発した。これによって血液濾紙片から測定用プレート上で直接セルプラスミンを抽出することが可能になり、現在実施されている新生児マススクリーニングと同様の手技でのホロセルプラスミンの測定が可能になった。新生児期濾紙血によるマススクリーニングのパイロットスタディを、検査センターレベルで進めていく上で、今回の測定法の改善は重要と思われる。

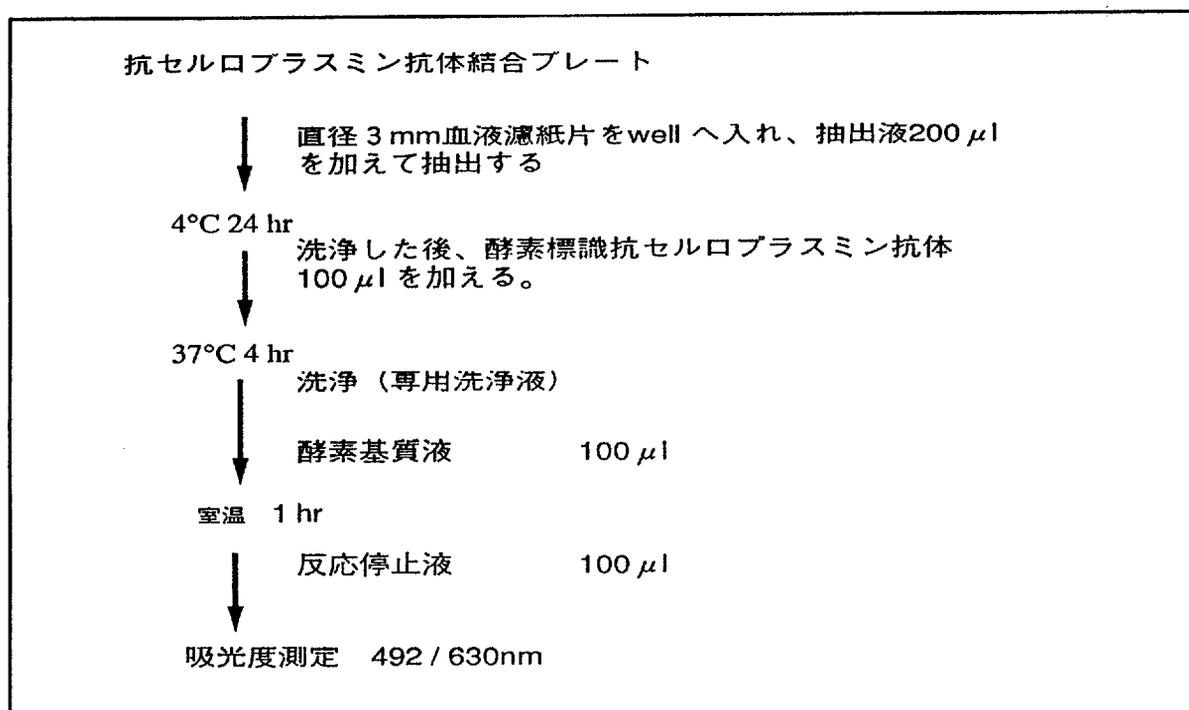
見出し語：ウイルソン病、マススクリーニング、セルプラスミン、モノクローン抗体

### I. はじめに

ウイルソン病は常染色体劣性の先天性銅代謝異常であり、治療にはD-ペニシラミンが有効である。発症前診断と早期治療は本症の予後を大きく改善することが期待され、マススクリーニングの可能性が検討されている。我々は、抗ホロセルプラスミンモノクローナル抗体を作成した。この抗体

はホロセルプラスミンと反応するが、アポセルプラスミンを認識しない。この抗体を用いた酵素抗体法により血中ホロセルプラスミンを測定したところ、ウイルソン病患者と対照者を容易に区別することができ、この系を用いたウイルソン病のマススクリーニングが可能であると考えられた。また毛細管血および濾紙血検体を用いたウイ

図1 測定プレート上でのセルプラスミンの血液濾紙からの直接抽出による血中ホリセルロプラスミンの測定法のフローチャート



ルソン病マススクリーニングの可能性についても検討してきた。しかし、これまでの酵素抗体法は一般的な検査としては極めて有用な方法であるが、マススクリーニングへの応用の観点から見ると、改善すべき点が多かった。とくに、濾紙血からのセルロプラスミンの抽出と希釈が煩雑で費用を要するために、マススクリーニングへの応用が障害されていた。そこで、本研究では、技術的にマススクリーニングへの応用が可能な測定系を開発した。この方法によって、今後必要とされる大規模なパイロットスタデーへの対応が可能になったものとする。

## II. 方法

### 1. モノクローナル抗体と酵素抗体法の開発

精製ヒトセルロプラスミンでマウスを免疫し、ハイブリドーマを作製した。抗体を産生する細胞

をクローン化して以下の実験に用いた。抗体は腹水から回収し精製した。酵素抗体法は、固層抗体として抗ヒトセルロプラスミンIgG（ヤギ）を用い、作製したモノクローナル抗体（CP60）を標識抗体とした。標準物質には既知の濃度のセルロプラスミンにセルロプラスミンフリー血清を添加して用いた。希釈した血清試料と反応後に発色させ、吸光度を測定した。

### 2. 酵素抗体法におけるアポ-ホリセルロプラスミンの測定

この実験に用いたホリセルロプラスミンはHoltzmanらの方法、アポセルロプラスミンはMorellらの方法により調製した。

### 3. 毛細管血および濾紙血中のホリセルロプラスミン測定

毛細管血を用いる方法では耳朶から18 µlの血液

を採取し、ただちに希釈液に入れ、希釈された検体中のホロセルプラスミンを酵素抗体法で測定した。濾紙血中のホロセルプラスミンの測定では濾紙血中のセルプラスミンを試験管内で抽出する従来の方  
法（従来法）と、EIA プレート上で直接濾紙からセルプラスミンを抽出する方法（直接測定法）の2者を試みた。

#### 4. 濾紙からの直接抽出法

直接法では採血した濾紙から 3 mm の濾紙片を punch out し、そのまま EIA プレートの測定用ウエル中へ入れ、4°C、24時間で抽出し、EIA によりセルプラスミン値を測定した（図1）。

### III. 結果

この酵素抗体法でアポセルプラスミンとホロセルプラスミンの混合溶液中のセルプラスミンを測定した結果、この方法はホロセルプラスミンだけを測定することが判明した。成人のウイルソン病患者血中のホロセルプラスミン値は濾紙血、毛細管血の何れを用いて測定しても、正常人より低値で、容易に区別出来た。

同じ濾紙血の検体を用いて、直接ウエルの中で抽出し測定したセルプラスミン値と、別に抽出した液を測定したセルプラスミン値とを比較してみた。その結果、同一検体から抽出した濾紙血のホロセルプラスミン値はよい相関を示した。また、抽出時間を変化させて、セルプラスミンの抽出効率を検討した。その結果を図2に示した。4°C、42時間を100%としたときの抽出効率は、18時間で97%、24時間で99.3%であり、24時間で十分に抽出できると考えられた。

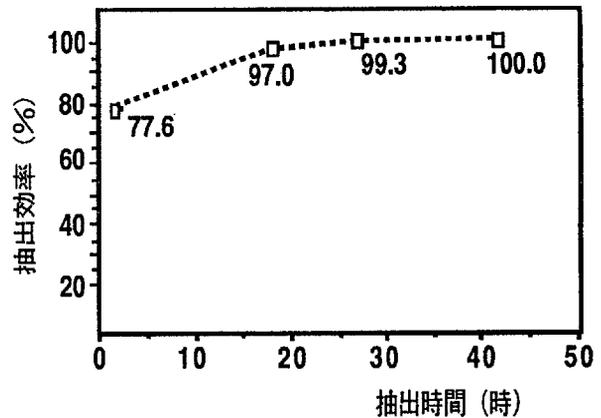


図2 直接法によるセルプラスミンの抽出効率

### IV. 考案

ホロセルプラスミンの特異的測定法の開発は、ウイルソン病のマススクリーニングに新しい可能性をもたらすものと考えられる。われわれは平成4年度の研究報告で述べたように、ヒトホロセルプラスミンを特異的に認識するモノクローン抗体を作製し、これを用いたホロセルプラスミン測定法を開発した。またこの方法で毛細管血検体と乾燥濾紙血検体を用いたホロセルプラスミンの測定が可能であり、基本的には、ウイルソン病のマススクリーニングが可能であると考えられた。

しかし、酵素抗体法をそのままマススクリーニングへ応用していくことは、手技の煩雑さと費用の面から困難であった。それは、抽出の過程で、試験管を用いた操作が加わるため、現在行われている新生児マススクリーニング検査と平行して行うことが不可能であったためである。我々の測定法に続いて、ほぼ同様の測定法が他のグループによってによって開発されたが、彼らの方法でも我々の従来の方  
法と同様の問題を抱えていた。今

回、われわれが直接抽出法を開発したことによって、これらの問題点が解決されたと言える。直接法による抽出の効率は従来の方法よりも優れていることが示唆されているので、新しい方法によってより正確なセルロプラスミン値が得られるものと期待される。

ウイルソン病のマスクリーニングの研究においては新生児期・乳児期でのホロセルロプラスミン値がウイルソン病の診断に有用であるかどうかを明らかにすることが重要である。そのためには大規模のコホート研究を組む必要があると思われる。今回のホロセルロプラスミンの測定法の実用的な改善は、これらの研究に大きく寄与するものと思われる。

謝辞：この研究にご協力いただいた化学及血清療法研究所（熊本市）および化学及血清療法研究所、武田堅吾氏に深謝いたします。

#### V. 参考文献

(1) 青木継稔 他：Wilson病. 小児科診療  
55 (11) : 2305-2312 (1992)

(2) Endo F et al. : J.Inher.Metab.Dis.  
Measurement of blood holoceruloplasmin by EIA  
using a mouse monoclonal antibody directed to  
holoceruloplasmin. Implication for mass screening of  
Wilson disease. (in press) (1994)



## 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



### 要旨

我々はこれまでの研究で、抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体(CP60)を開発し、これを利用した酵素抗体法によるホロセルロプラスミン測定系を開発してきた。この方法は正常人とウィルソン病患者を区別し、ウィルソン病患者を診断するのに優れた方法であることをこれまで示してきた。その一方で、濾紙血液を用いたマススクリーニングへの応用を実施するには、抽出から測定に至る手技を簡略化することが最も重要な課題であった。そこで本年度の研究では、濾紙血検体を用いたホロセルロプラスミンの直接測定法を開発した。これによって血液濾紙片から測定用プレート上で直接セルロプラスミンを抽出することが可能になり、現在実施されている新生児マススクリーニングと同様の手技でのホロセルロプラスミンの測定が可能になった。新生児期濾紙血によるマススクリーニングのパイロットスタディを、検査センターレベルで進めていく上で、今回の測定法の改善は重要と思われる。