

抗ヒト活性型セルプラスミンモノクローナル抗体キットの基礎的性能
(分担研究：マスキリング対象疾患一次スクリーニングから二次スクリーニングの
あり方に関する研究)

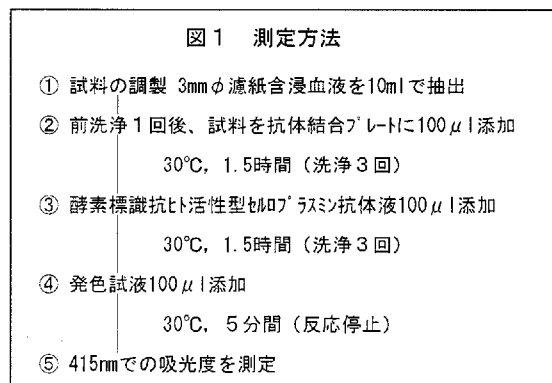
池田英紀*、吉田 博*、後藤 寛*
冷牟田修一**、門田明彦**
青木継稔***

要約 ウィルソン病マスキリング用に、抗ヒト活性型セルプラスミンモノクローナル抗体を使用してのELISAキットを作製し、これに関する基礎的検討を実施した。

試薬の基礎的検討に関しては、セルプラスミン酵素活性との相関性、プレートウェル間の同時再現性、ロット間差同時再現性および感度試験を実施し、それぞれで良好な試験成績を示した。また、操作上の留意事項の検討に関しては、反応温度および時間の正確性や洗浄操作の徹底で測定操作上の誤差が軽減できることが確認できた。

見出し語 ウィルソン病、マスキリング、活性型セルプラスミン、ELISA

研究方法 ウィルソン病マスキリング用にELISAを測定原理とする、抗ヒト活性型セルプラスミンモノクローナル抗体キットを作製した。これを、図1の測定方法に従い測定し、試薬の基礎的検討と操作上の留意事項の検討を実施した。



* (株)ニッショー総合研究所

** 出光興産中央研究所

*** 東邦大学第2小児科

結果 試薬の基礎的検討

セルロプラスミン酵素活性との相関性試験（図2）では他社製のセルロプラスミン活性測定試薬との測定値の相関を検討した。その結果、 $y=0.9635x-0.0694$ $r=0.9747$ ($N=90$) と非常に良好な相関を示した。これより本キットがセルロプラスミン活性と相関があることを確認できた。

プレートウェル間の同時再現性試験（図3）ではプレート全ウェル同一試料を添加し検討した。その結果、行 ($n=12$) でのC.V.値が2.40~3.53%、列 ($n=8$) でのC.V.値が1.94~3.87%、そして総ウェル ($n=96$) でのC.V.値が3.48%と良好な同時再現性を示した。これよりプレートウェル間の同一性を確認できた。

ロット間差同時再現性試験（図4）では、3水準の濾紙血液を3ロットのキットを使用して検討した。その結果、C.V.値が4.16~7.43% ($n=10 \times 3$ ロット) と良好なロット間差再現性を示した。これよりロット間の同一性を確認できた。

感度試験（図5）では、活性型セルロプラスミンの測定範囲と検量線性と検討した。その結果、0-40mg/dlで検量線各点の平均値 $\pm 2S.D.$ が、その前後の点での平均値 $\pm 2S.D.$ に重複しなかった。これより検量線性は0-40mg/dlで良好で、測定範囲は0-40mg/dlまで可能であることを確認できた。

操作上の留意事項の検討

プレートの反応温度に関して検討し、以下の留意事項を得た。反応中にプレートをウォーターバスに浮遊させることによりプレート底面の温度を均一にした場合は再現性が良好になり、逆に、実験室に放置した場合や構成試薬を反応温度に戻さなかった場合の再現性は不良であった。

図2 セルロプラスミン酵素活性との相関性試験

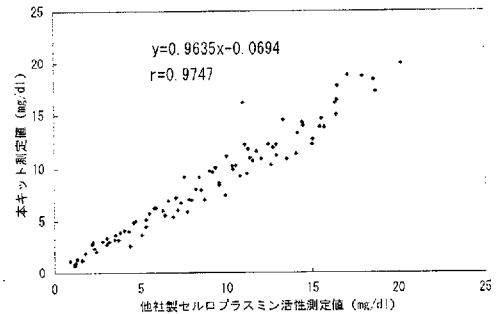


図3 プレートウェル間の同時再現性試験

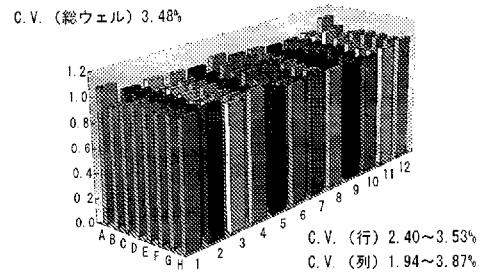
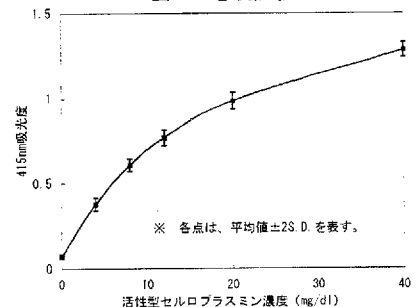


図4 ロット間差同時再現性試験

サンプル	濾紙血液A			濾紙血液B			濾紙血液C		
	960329	960112	950930	960329	960112	950930	960329	960112	950930
1	0.256	0.248	0.234	0.439	0.430	0.372	0.656	0.660	0.535
2	0.272	0.275	0.234	0.427	0.416	0.382	0.688	0.653	0.654
3	0.260	0.282	0.235	0.436	0.421	0.387	0.684	0.653	0.648
4	0.273	0.278	0.245	0.437	0.421	0.385	0.719	0.657	0.669
5	0.275	0.283	0.241	0.443	0.426	0.409	0.683	0.681	0.652
6	0.248	0.277	0.248	0.423	0.412	0.382	0.681	0.648	0.648
7	0.272	0.287	0.244	0.453	0.425	0.407	0.684	0.655	0.630
8	0.277	0.285	0.246	0.440	0.432	0.403	0.692	0.687	0.651
9	0.253	0.258	0.245	0.475	0.459	0.397	0.692	0.721	0.551
10	0.283	0.291	0.236	0.480	0.432	0.389	0.726	0.726	0.613
N	30 n=10×3LOT			30 n=10×3LOT			30 n=10×3LOT		
MEAN	0.2635			0.4210			0.6720		
S.D.	0.0196			0.0245			0.0279		
C.V.	7.43%			5.82%			4.16%		

図5 感度試験



反応時間に関しては、ウェル間の反応時間間隔を一定にした場合は再現性が良好になったが、プレート間で反応時間間隔を一定にした場合は再現性が低下することがあった。

洗浄に関しては、洗浄後の洗浄液を吸引除去しプレートをつッピングし、完全に除去した場合は再現性が良好になったが、洗浄液を吸引除去しただけでつッピングしなかった場合は再現性は不良であった。また、試料の添加前に前洗浄をした場合は再現性は良好であったが、しなかった場合は再現性が低下することがあった。

以上より得た操作上の留意事項を図6に示す。

考察 試薬の基礎的検討で、相関性、ウェル間同時再現性、ロット間差同時再現性、感度と基礎的な試薬性能が良好であることが確認できた。これにより、本キットはウィルソン病マススクリーニングに有用なキットであることが確認できた。但し、操作上の留意事項の検討で得た事項を遵守しない場合は試薬性能を損ねる可能性もあることも確認できた。

文献

S,HIYAMUTA,et.al.,HYBRIDOMA 13(2),1994,
139-141

図6 操作上の留意事項

- | | |
|--------|---|
| 1 反応温度 | 1. 反応中はプレートの温度を一定に保つ。
2. 反応中は温度が一定でないところに放置しない。
3. 構成試薬は反応温度に戻してから使用する。 |
| 2 反応時間 | 各ウェルの反応時間間隔は同一にする。 |
| 3 洗 浄 | 1. 洗浄液は完全に取り除く。
2. 試料の添加前も洗浄する。 |



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 ウィルソン病マススクリーニング用に、抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体を使用しての ELISA キットを作製し、これに関する基礎的検討を実施した。

試薬の基礎的検討に関しては、セルロプラスミン酵素活性との相関性、プレートウェル間の同時再現性、ロット間差同時再現性および感度試験を実施し、それぞれで良好な試験成績を示した。また、操作上の留意事項の検討に関しては、反応温度および時間の正確性や洗浄操作の徹底で測定操作上の誤差が軽減できることが確認できた。