

Immunonephelometry 及び Immunoturbidimetry による 乾燥濾紙血液の Apolipoprotein-AI 及び Apolipoprotein-B 測定方法の検討

扇谷 陽子 水嶋 好清 福士 勝 清水 良夫
菊地由生子

要 旨

家族性高コレステロール血症 (以下 FH と略) スクリーニングへ応用するために, Immunonephelometry (以下 N 法と略) 及び Immunoturbidimetry (以下 T 法と略) により乾燥濾紙血液 (以下 DBS と略) 中の, Apolipoprotein (以下 Apo と略) -AI, Apo-B を測定する方法を検討した。N 法・T 法の両法とも, 測定時間が短く, 再現性に優れ, 血清測定法との相関も Apo-AI と Apo-B のいずれも相関係数が 0.87-0.96 と良好であった。25℃ で 1 週間保存した場合の安定性は, Apo-AI は両法とも 10% 以内の減少であったが, Apo-B は N 法で 10% の増加, T 法で 40% 減少した。37℃ ではさらにこの傾向が著しかった。従って検体の取り扱いには十分注意を要する。測定感度は両法とも Apo-AI・Apo-B は 15mg/dl までの測定が可能であり, 新生児検体でも十分測定でき, 高値検体も希釈による測定が可能であった。また, 生後 5-7 日の新生児の平均値 ± S. D は, N 法の Apo-AI で 85.6 ± 22.1mg/dl, Apo-B で 52.5 ± 19.2mg/dl, T 法の Apo-AI で 96.7 ± 19.6mg/dl, Apo-B で 44.8 ± 8.2mg/dl とこれまでの報告とよく一致した。以上の点から, N 法は FH スクリーニング法として有用といえる。T 法については, N 法以上に検体の運搬・保管の際の温度について留意することによりスクリーニングに使用できる。

1. 緒 言

家族性高コレステロール血症は, 常染色体優性遺伝性疾患であり, そのヘテロ患者の発生頻度は 500 人に 1 人と極めて高率である。本症では, 小児期より血液中の LDL-コレステロールが高値で, 動脈硬化が徐々に進行しており, 心筋梗塞のハイリスクグループである。馬淵らの報告¹⁾によると FH ヘテロ患者の 66% が心臓死し, その死亡平均年齢は男性で 55 歳, 女性で 68 歳であり, ホモ患者では 100% が心臓死し, その死亡平均年齢は 26 歳であったという。これを予防するためには, 早期のスクリーニングによる本症の発見と適切な食事指導, 生活週間の管理が必要である。

本症のスクリーニングとしては, 新生児期に, 血清及び DBS を用いて, コレステロールを測定する方法²⁾³⁾, 免疫一次拡散法⁴⁾, ロケット免疫法⁵⁾, ELISA 法⁶⁾, N 法⁷⁾⁸⁾ によりアポタンパクを測定する方法がすでに報告されている。今回, 著者らは, DBS を用いて, 自動化が可能な N 法と T 法による Apo-AI・Apo-B の測定法について基礎的な検討を行い, 新生児での FH スクリーニングの可能性を検討したので報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

基礎的検討には, 成人血液及び同量の赤血球を加えたブルー血清を 50 μ l ずつスクリーニング用濾紙 (東洋濾紙株式会社製) にスポットしたサンプルを用いた。新生児及び同児の 1 ヶ月後の値の測定には, 札幌市内の医療機関から検査を依頼された乾燥濾紙血液検体を用いた。

2-2 試 薬

N 法には, N Antiserum to human Apolipoprotein AI (rabbit), N Antiserum to human Apolipoprotein B (rabbit), N Diluent, N Reaction Buffer 及び N Supplementary Reagent を, 標準品は Apolipoprotein AI and B (Behring 社製) を使用した。

T 法には, 血清アポリポ蛋白測定用キットアポオート・2「第一」(抗血清・ヤギ) 及びアポ B オート・2「第一」(抗血清・ヤギ) を, 標準品はアポオート「第一」標準血清 (第一化学薬品株式会社製) を使用した。

2-3 測定装置

N 法の測定には Behring Nephelometer 100

Analyser (Behring 社製) を使用した。この装置はサンプルに発光ダイオードからの波長 840nm の光を照射し、免疫複合体生成前後の散乱光強度を測定し、その差より免疫複合体の生成量を測定することを主原理とする。

T 法での測定には COBAS MIRA S (ROCHE 社製) を使用した。この装置は、免疫複合体の生成前後の 600nm の波長の吸光度を測定し、その差より免疫複合体の生成量を測定することを主原理とする。

2-4 測定方法

測定は、DBS からアポタンパクを抽出し、その抽出液を測定装置にセットし、これに抗血清を添加して免疫反応させ、その生成量を散乱光の変化により測定するという流れで行った。

(1) DBS からの Apo-AI, Apo-B の抽出

表 1 Nephelometry で使用する試薬

	Apo-AI		Apo-B	
	Serum ($\mu\ell$)	DBS ($\mu\ell$)	Serum ($\mu\ell$)	DBS ($\mu\ell$)
サンプル	10 $\mu\ell$ *	50	20 $\mu\ell$ *	100
N-希釈液	80	50	80	40
N-反応緩衝液	80	50	80	40
抗血清	40	40	40	40
N-補助試薬	10	10	-	-

* N-希釈液で20倍に希釈したサンプル

サンプルは 3.2mm 径の DBS 4 枚を使用し、抽出液として 0.15M NaCl 含有 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.4) (以下 PBS と略) を 500 $\mu\ell$ 使用、抽出は 4 $^{\circ}$ C 一晚静置することにより行った。

(2) N法による測定

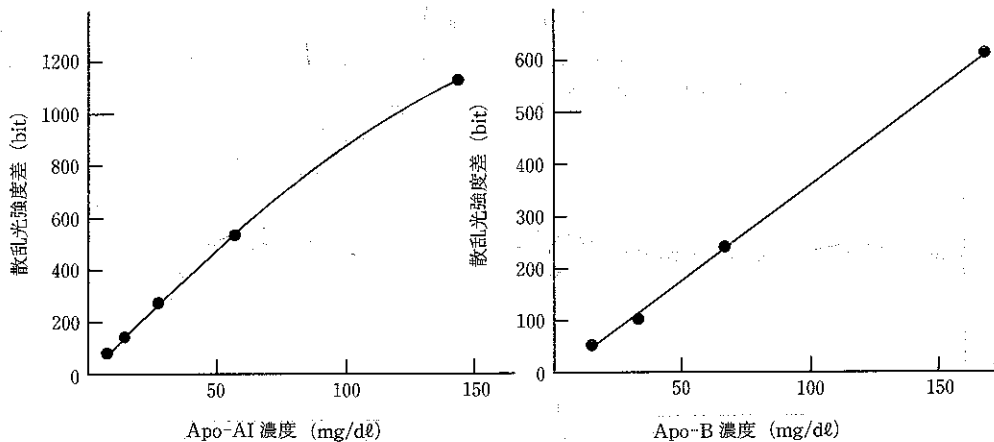


図 1 乾燥濾紙血液をサンプルとした Nephelometry における標準曲線

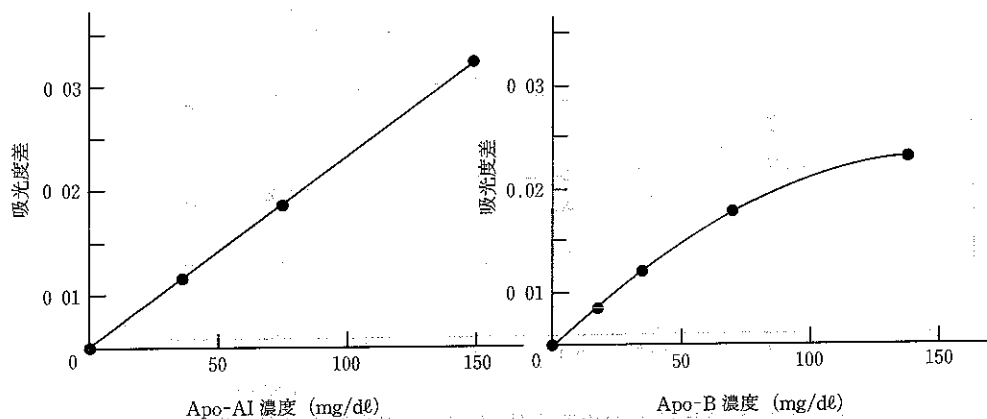


図 2 乾燥濾紙血液をサンプルとした Turbidimetry における標準曲線

血清の測定は指示書に従って行った。すなわち表 1 に示す量の試薬を混合し、混合直後及び室温で 6 分間反応させた後に散乱光強度を測定し、その反応前後の差を求め、標準物質を使用して作成した標準曲線より濃度を算出した。DBS については反応時間を 30 分間とし、濃度既知のプール血清に赤血球を加えて作成した乾燥濾紙血液をもちいて図 1 に示すよ

うな標準曲線を作成し濃度を計算した。

(3) T 法による測定

血清の測定は指示書に従って行った。すなわち表 2 に示す量の試薬を混合し、混合直後及び 37°C で 5 分間反応させた後に吸光度を測定し、その反応前後の差を求め、標準曲線より濃度を算出した。DBS については反応時間を 16 分間とし、N 法と同様にして作成した乾燥濾紙血液をもちいて図 2 に示すような標準曲線を作成し濃度を計算した。

表 2 Turbidimetry で使用する試薬

	Apo-AI		Apo-B	
	Serum ($\mu\ell$)	DBS ($\mu\ell$)	Serum ($\mu\ell$)	DBS ($\mu\ell$)
サンプル	3 $\mu\ell$	30	5 $\mu\ell$	50
PBS*	10	10	10	10
緩衝液	350	100	350	100
抗血清	85	40	60	30
精製水**	10	10	10	10

* : サンプル用押し出し液
** : 抗血清用押し出し液

3. 結果

3-1 抽出液の検討

DBS から Apo-AI, Apo-B を抽出する溶液について検討した。抽出液として PBS 及びこれに 0.01 ~ 2.0% の割合で界面活性剤の Tween 20 または Triton X100 を添加した溶液 500 $\mu\ell$ を使用して、4°C で一晩静置により抽出を行い N 法により測定し、散乱光強度差を比較した。結果は図 3 のとおりで、Apo-B

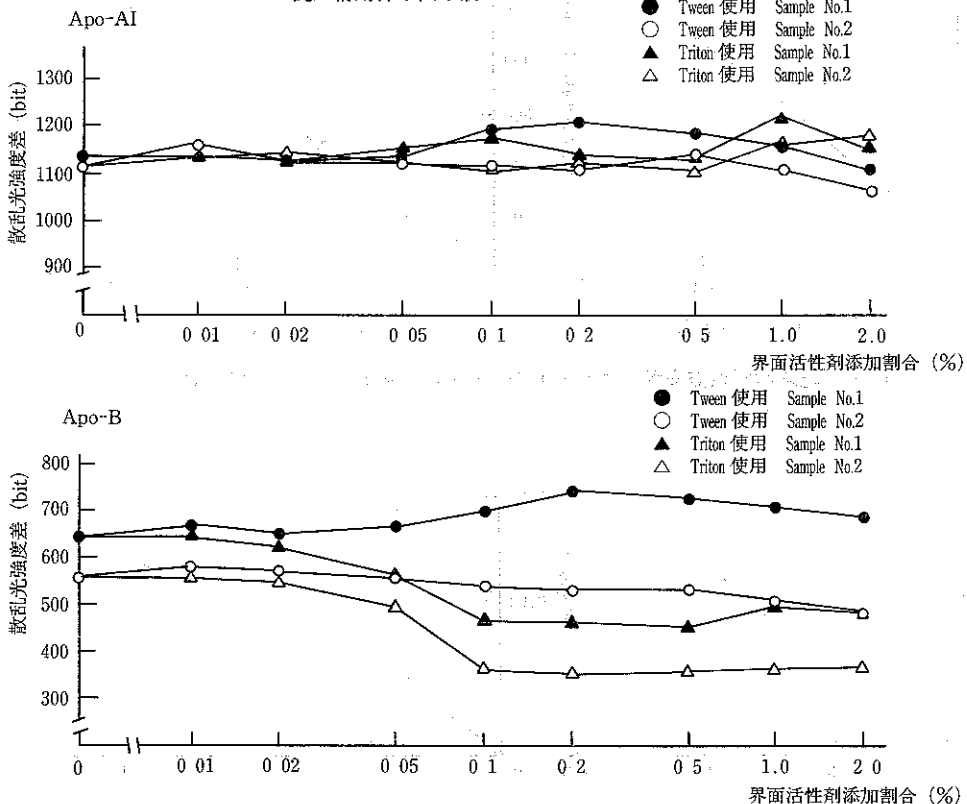


図 3 溶出液に添加した界面活性剤の割合による散乱光強度の変化

表3 乾燥濾紙血液Apo-AI及びB測定の変動係数

Nephelometry		
	平均値±標準偏差 (mg/dℓ)	変動係数(%)
Apo-AI 測定内変動		
Sample-1	162.6±10.5	6.5
Sample-2	143.8±2.6	1.8
Apo-AI 測定間変動		
Sample-3	138.8±8.3	6.0
Sample-4	156.2±5.4	3.5
Apo-B 測定内変動		
Sample-1	143.8±8.2	5.7
Sample-2	177.2±4.2	2.3
Apo-B 測定間変動		
Sample-3	149.2±16.1	10.8
Sample-4	185.0±19.8	10.7

測定内変動 n=8
測定間変動 n=5

Turbidimetry		
	平均値±標準偏差 (mg/dℓ)	変動係数(%)
Apo-AI 測定内変動		
Sample-5	140.6±3.4	2.4
Sample-6	129.9±5.2	4.0
Apo-AI 測定間変動		
Sample-7	144.9±12.8	8.8
Sample-8	149.8±14.8	9.9
Apo-B 測定内変動		
Sample-5	56.0±3.5	6.2
Sample-6	79.9±12.1	15.2
Apo-B 測定間変動		
Sample-7	89.6±8.1	9.1
Sample-8	124.4±14.9	12.0

測定内変動 n=8
測定間変動 n=10

は、Triton X100を添加した溶液を使用して抽出した場合、添加割合の増加に伴い散乱光強度の差が減少し、Tween 20を添加した場合、サンプルにより傾向が分離した。そこで抽出液は、界面活性剤を含まないPBSとした。

- Apo-AI
- Apo-B

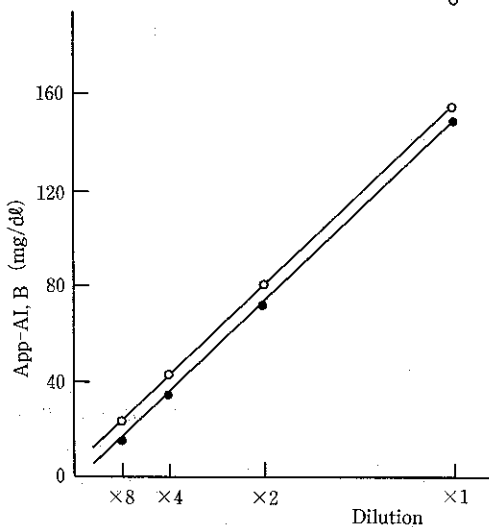


図4 Nephelometryにおける希釈試験

3-2 抽出時間及び温度の検討

DBSからApo-AI、Apo-Bを抽出する時間及び温度をN法により検討した。抽出液としてPBSを使用し、抽出時間を2、4、6、16、24時間とし、4℃と25℃の2つの温度で比較した。結果は2時間以降24時間まで時間及び温度による差異はほとんど認められなかった。さらに、4℃の温度条件で0.02% Tween 20含有PBSでも検討したが同様だった。そこで、抽出時間による差はないことから、抽出は4℃一晩で行うことにした。

3-3 測定内・測定間の変動

DBSをサンプルとして使用した場合の測定内・測定間の変動を調べた。結果は、表3に示すとおりN法・T法ともに、測定内変動がApo-AIで6.5%以内、Apo-Bで15.2%以内、測定間変動がApo-AIで9.9%以内、Apo-Bで12.0%以内とそれぞれで良好だった。

3-4 希釈試験

サンプルをPBSで希釈し、N法・T法のApo-AI、Apo-Bでそれぞれについて測定した。結果はN法についてのみ図4に示すが、いずれも良好な直線関係を得た。

3-5 保存試験

2種類の濃度のサンプル (Apo-AI: 164・173

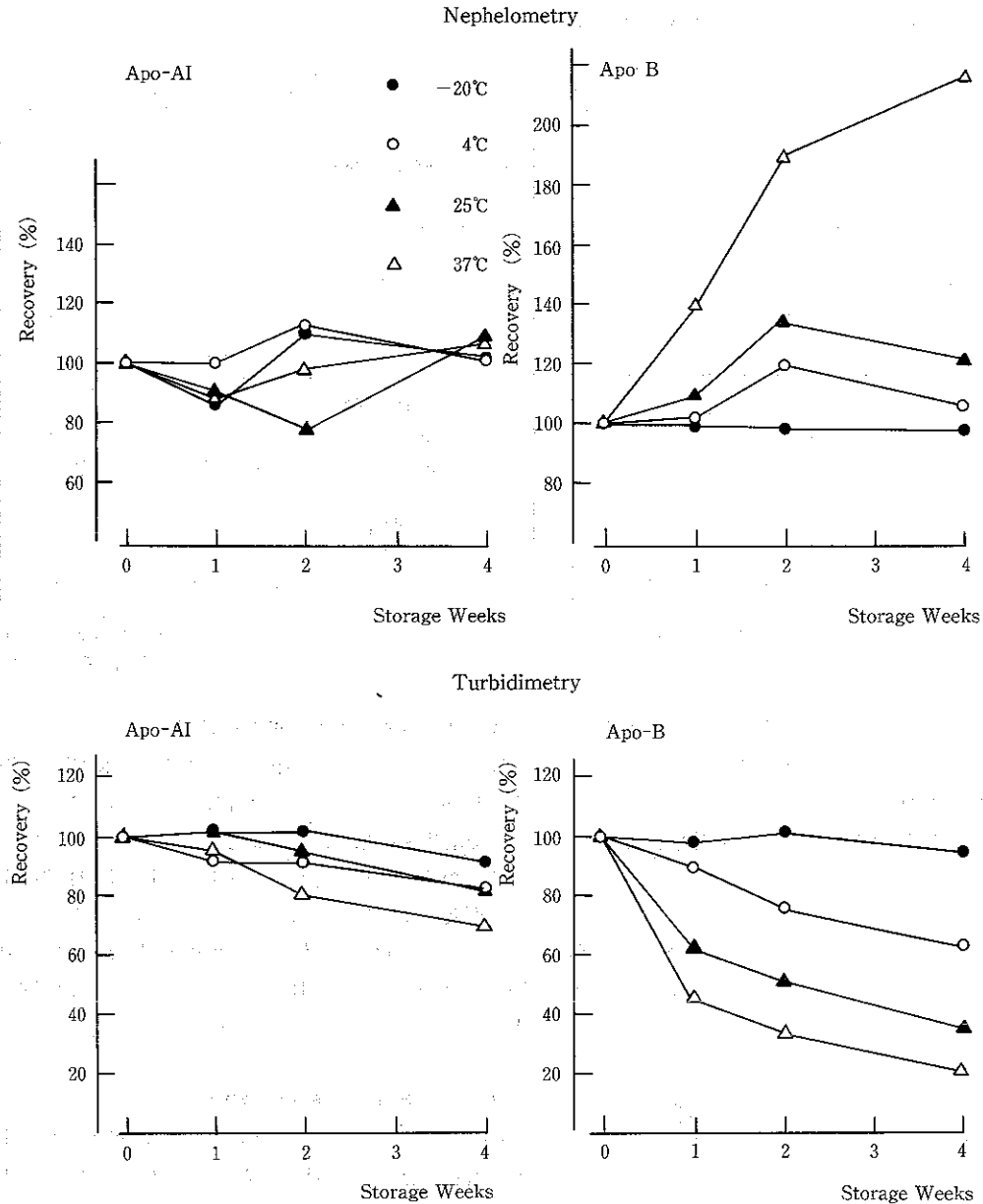


図5 保存安定性試験

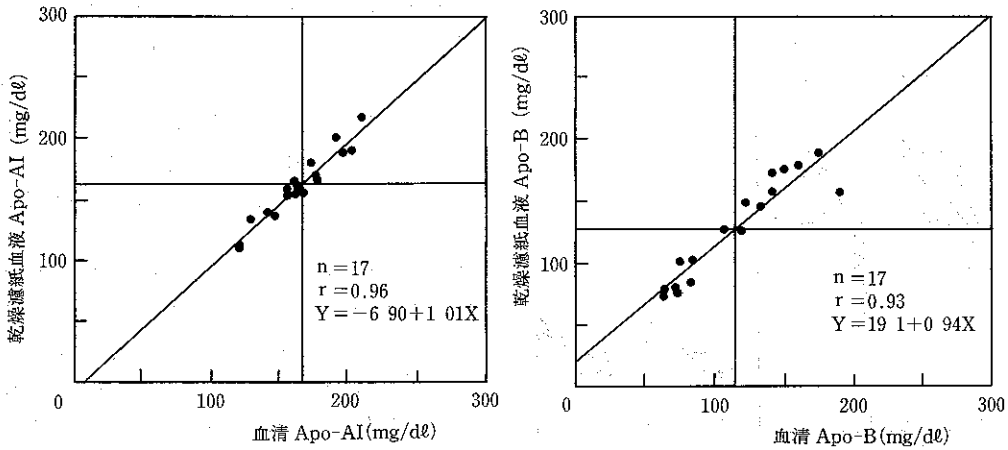
mg/dℓ, Apo-B 64・141mg/dℓ)を-20, 4, 25, 37℃の4温度で1, 2, 4週間保存し, その保存安定性を調べた。結果は2種類の濃度とも同様の傾向で, その1つ (Apo-AI 164mg/dℓ, Apo-B 64mg/dℓ) について図5に示した。特に Apo-Bが不安定で, 2つの方法で傾向が異なり, 25℃で1週間保存した場合N法で測定値が10%増加, T法で40%減少し, 37℃では特にそ

の傾向が著しかった。

3-6 血清との相関

健常成人17名の血清と同時に採血した血液50μℓを濾紙にスポットして作成したDBSをサンプルとして, N法・T法それぞれについて相関関係を調べた。結果は図6に示すとおり良好な相関関係を認めた。

Nephelometry



Turbidimetry

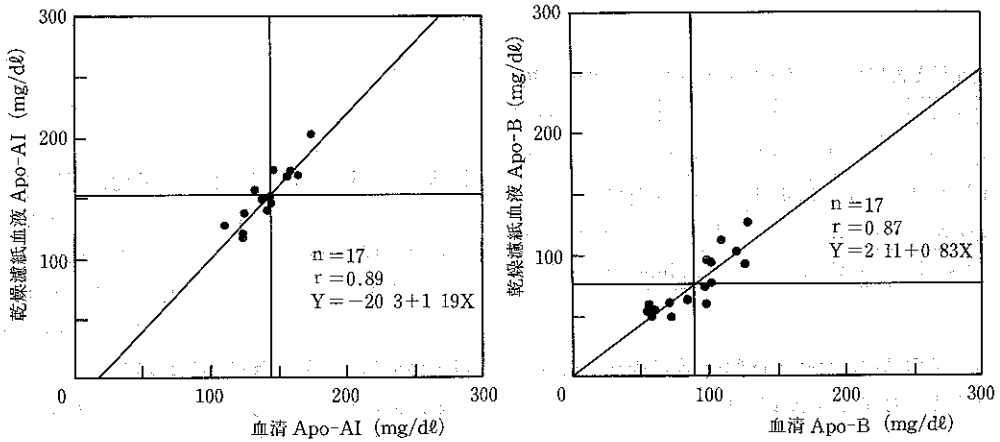


図6 血清 Apo-AI・B と乾燥濾紙血液 Apo-AI・B の相関

3-7 N法とT法の相関

4-6の健常成人17名の測定結果を用いて、N法・T法2つの方法の相関関係を調べた。血清の場合、相関係数がApo-AIで $r=0.95$ 、Apo-Bで $r=0.98$ 、DBSの場合にはApo-AIで $r=0.92$ 、Apo-Bで $r=0.91$ と良好な相関を認めた。

3-8 新生児のApo-AI, Apo-B値

生後5-7日の新生児のApo-AI, Apo-B値を測定した。N法について90名、T法について269名測定した平均値±S.D.は、N法のApo-AIで 85.6 ± 22.1 mg/dℓ、Apo-Bで 52.5 ± 19.2 mg/dℓ、T法のApo-AIで 96.7 ± 19.6 mg/dℓ、Apo-Bで 44.8 ± 8.2 mg/dℓで

あった。

3-9 生後5-7日の新生児と同児の1ヶ月後のApo-AI, Apo-B値の比較 (T法)

男女各10名の新生児と、同児の1ヶ月後のApo-AI, Apo-B値について比較した。結果は図7及び表4に示すとおりで、その平均値±S.D.は、生後5-7日の新生児のApo-AIで 92.8 ± 15.2 mg/dℓ、Apo-Bで 41.2 ± 7.1 mg/dℓ、1ヶ月後のApo-AIで 165.4 ± 38.1 mg/dℓ、Apo-Bで 51.7 ± 9.3 mg/dℓであった。生後5-7日及び1ヶ月後の値の男女差は、Apo-AI, Apo-Bそれぞれについて5%の危険率でt検定した結果認められなかった。生後5-7日と1ヶ

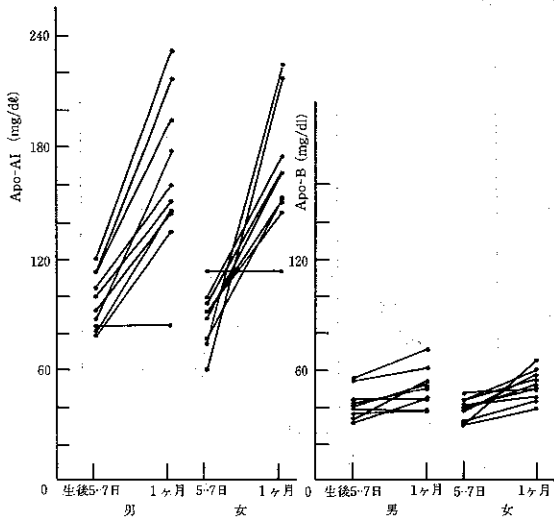


図7 生後5-7日の新生児の乾燥濾紙血液Apo-AI・B値及び同児の1ヶ月後の値

表4 新生児と同児の1ヶ月後のApo-AI・Apo-Bの比較

平均値±S.D.(mg/dl)	全 体	男 児	女 児
新生児Apo-AI	92.8±15.2	97.8±14.7	87.8±14.6
1ヶ月児Apo-AI	165.4±38.1	164.5±43.3	166.4±34.4
新生児Apo-B	41.2± 7.1	41.6± 8.1	40.9± 6.4
1ヶ月児Apo-B	51.7± 9.3	50.2±10.8	53.2±7.9

月後についての値は、Apo-AI・Apo-Bの両法とも5%の危険率で1ヶ月児で有意な増加を認めた。

4. 考 察

FHは、常染色体優性遺伝性疾患であり血液中のLDL-コレステロールが高値であることが知られている。高LDL血症患者を見いだすには、総コレステロールを測定するよりApo-Bの方が感度と特異性の点で優れているとの報告⁹⁾がある。そこでDBSをサンプルとしたApo-Bの測定を検討した。また、動脈硬化との関連を考える場合、LDL-コレステロールの上昇とともに、HDL-コレステロールの減少の確認も必要なことから、Apo-AIについても、併せて検討した。

今回検討したDBSによるN法・T法は、測定内・測定間の変動係数が表3に示すとおり小さく、血清との相関も相関係数が0.87-0.96の範囲にあり良好であった。また、いずれも15mg/dlまでの測定が可能で

あり、血中濃度が成人に比較して低い新生児についても十分測定でき、希釈試験も直線性を有することから、希釈による高値検体の測定も可能である。さらに、新生児を測定した平均値が既に報告のあるもの^{9) 10) 11)}とよく一致した。検討の中で、2つの方法に相違を認めたのは、Apo-Bの保存安定性である。Apo-Bの保存安定性についての報告には、測定値が上昇するというもの⁹⁾、下降するというもの^{9) 12)}の両者があり、統一された見解に至っていない。今回、同じサンプルをN法とT法で測定したが、それぞれの方法は、散乱光強度を測定するか透過光を測定するかの違いを有するが、主原理は類似している。そこで傾向が分離した原因として異なる抗血清を使用したことに起因する可能性が強く、幾つかの報告^{13) 14)}に指摘されているような保存中にリボタンパクの中に隠されていた認識部位が露出したり、認識部位が構造変化を受けた等が考えられる。しかし、これらの点を明らかにするには、さらに検討を行う必要がある。スクリーニングを実施する場合、Apo-Bが不安定なことから、サンプリング後の保管・管理や運搬の際の温度に留意を要するが、集団検診などの場で行えばこれらの問題は解決できると考える。さらに血清と比較して、採血量が少ない・運搬が容易・保管スペースを要しないなどのメリットは残る。以上の点から、今回検討したN法はFHスクリーニング法として有用といえる。T法については、N法以上に検体の運搬・保管の際の温度について留意する必要があるが、それらが可能であればFHスクリーニング法として使用できる。

FHスクリーニングの実施時期については、生後5-7日の新生児は、同児の1ヶ月後の値との比較で明らかなおりに血液中のアポタンパクの濃度が安定していないことからスクリーニングの時期として不適當である。学童期では、すでにFH以外の高コレステロール血症の割合が高く¹⁵⁾、FHのスクリーニングは難しい。以上より、実施時期としては、血液中のアポタンパク濃度が安定した¹⁶⁾1歳半及び3歳での乳児検診のシステムを用いるのが適當と考えられる。

5. 結 語

N法及びT法で、DBSのApo-AI・Apo-Bの測定について検討した。いずれの方法とも、感度・再現性・血清との相関が良好で、FHスクリーニング法として

有用な方法といえる。ただし、Apo-Bが不安定なことから、これらの方法、特にT法を使用する場合、検体の取り扱いに十分留意を要する。

FHスクリーニング実施時期については、血液中のアポタンパク濃度が安定した1歳半及び3歳の乳児検診のシステムを用いるのが適当と考えられる。

6. 文 献

- 1) 馬淵 宏, 他: 日本医事新報, 3396, 11-19, 1989.
- 2) Gunnar, E. et al: Acta Paediatr. Scand., 68, 541-545, 1979.
- 3) Asami, T: Lancet, ii, 229-230, 1980.
- 4) Barbara, L. B. al: Paediatr Res., 23, 500-504, 1988.
- 5) Lane, D. M. et al: Paediatr Res., 20(4), 332-337, 1986.
- 6) Ohta, T et al: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 7, 524-531, 1988.
- 7) Monique Koffigan, et al: Clin. Lab., 12, 169-172, 1982.
- 8) Van Bierliet, J. P. et al: Clinica Chimica Acta,

- 120, 191-200, 1982.
- 9) Barbara, A. D. et al: J Paediatr., 117, 358-363, 1990.
- 10) Van Biervliet, J. P. et al: Acta Paediatr. Scand., 117, 851-856, 1981.
- 11) Strobl, W et al: Acta Paediatr. Scand., 72, 505-509, 1983.
- 12) Wang, X. L. et al: CLIN CHEM., 35(6), 1000-1004, 1989.
- 13) Paolo Da Col, et al: CLIN CHEM., 29(6), 1045-1050, 1983.
- 14) Michael La Belle, et al: Clinica Chimica Acta, 191, 153-160, 1990.
- 15) 村田光範: 医学のあゆみ, 157(13), 776-780, 1991.
- 16) Noma, A. et al: Clinica Chimica Acta, 199, 147-158, 1991.
- 17) 大竹皓子: 検査と技術, 16(7), 599-605, 1988.
- 18) 中村倫恵, 他: 日本小児科学会雑誌, 95(1), 59-63, 1991.

Immunonephelometry and Immunoturbidimetry for Apolipoprotein AI and B on Dried Blood Sample

Yoko Ogiya, Yoshikiyo Mizushima,
Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu,
Yuko Kikuchi

ABSTRACT

We examined immunonephelometry and immunoturbidimetry for apolipoprotein AI and B on dried blood samples in order to use mass screening for familial hypercholesterolemia.

These two methods are rapid and sensitive and good correlation between dried blood samples and serum samples of healthy adults.

But apolipoprotein B is not stable

So, we need to carry at low temperature and treat carefully.

The values of newborn babies are almost the same with the values already reported.

From these results, these two methods are useful to use mass screening for familial hypercholesterolemia.