

乾燥濾紙血液サンプルのコレステロールの測定方法

扇谷 陽子 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スクリーニングへ応用するため、乾燥濾紙血液の総コレステロール値の測定方法について検討した。メタノールで血球の固定とコレステロールの抽出を行い、これを酵素法の市販キットで測定することにより、3.2mmディスク1枚の少ないサンプル量で再現性や血清との相関が良好な測定ができることが判った。さらにこの方法は操作法が簡便で測定時間が短く、サンプルの保存による抽出率への影響が少ないことからスクリーニング法として有用と考えられる。

1. 緒 言

最近、食生活の欧米化などにより小児においても高脂血症が問題となっている。ところで、高脂血症には原発性のもものと続発性のもものがある。続発性のものには食事性のももの、その他種々の疾患に伴うものがある。この中では食事性のもものが占める割合が高いが、これらは保健教育や啓蒙活動による食生活の改善や運動により予防してゆくことが望ましいと考えられている。しかし原発性、特に常染色体優性遺伝でそのヘテロ接合体の発症頻度がおよそ500人に1人と高く、新生児期より血液中コレステロール高値を示す家族性高コレステロール血症では無症状のまま動脈硬化が進行し、特に男性では30才以降何才で心筋梗塞をひきおこしても不思議でない¹⁾とさえいわれており、スクリーニングによる早期発見が必要と考えられている。そこで国内でも既に幾つかの施設がアポタンパクや総コレステロールを指標にしたスクリーニングの取り組み²⁾³⁾⁴⁾をしている。乾燥濾紙血液のコレステロール値の測定方法は種々の報告⁵⁾⁶⁾⁷⁾がある

が、これらの方法には操作の煩雑さ、サンプル量、感度等の面で問題がある。今回、簡便で感度良い測定法について検討を行い良好な結果を得たので、その結果について報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

検討に用いるスタンダードは赤血球にコレステロール260mg/dlのプール血清及びその希釈液を添加し50 μ 1づつスクリーニング用濾紙(東洋濾紙株式会社製)にスポットし作成したものを用いた。なお、濃度0mg/dlはウシ血清アルブミンを添加したリン酸緩衝液により作成した。

血清と乾燥濾紙血液での相関を求める為のサンプルは、成人59名から採血した血液を用いた。これらは、一部をスクリーニング用濾紙にスポットし残りを血清として分離し使用した。

生後5-7日及び1ヶ月の新生児の正常値を求める為のサンプルはクレチン症等の検査のため市内の産科医院から送付された乾燥濾紙血

液検体を用いた。

2-2 試薬

コレステロールの抽出に用いるメタノール、エタノール及びイソプロパノールは和光純薬社製特級試薬を用いた。酵素法による測定には血清総コレステロールの測定用キットであるコレステザイム-V555栄研(栄研化学社製)を用いた。このキットは、その発色試薬105mlにつきコレステロールエステラーゼ102単位、コレステロールオキシダーゼ20単位、ペルオキシダーゼ50単位、4-アミノアンチピリン6.50mg及びN-エチル-N-(β-メチルスルホンアミドエチル)-m-トルイジン(EMST)146mgを含有し図1に示す反応を測定原理としている。

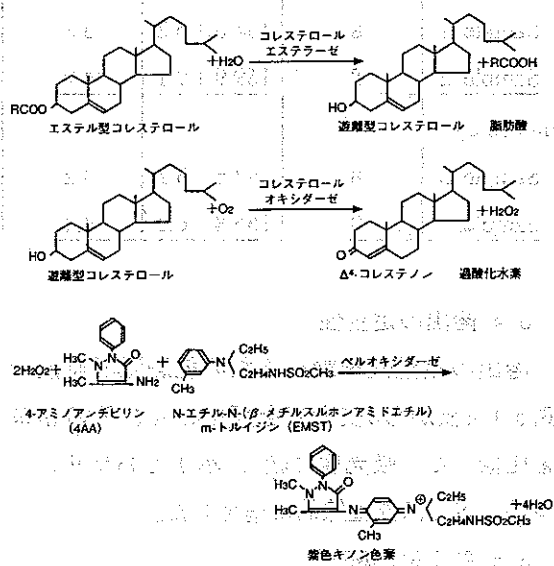


図1 酵素法による測定原理

2-3 器具及び装置

- (1) 平底プレート
Microwellplate (Nunc 社製)
- (2) プレート用蓋
Disposable Cap (Beckman 社製)
- (3) ミキサー

Micro Mixer Model MX-4(三光純薬社製)

- (4) マイクロプレートリーダー

Emax (Molecular Devices 社製)

- (5) 計算用コンピューター

NEC PC-9801VX (NEC社製)

2-4 測定方法

測定手順は、以下に示すとおりで抽出溶剤および抽出時間は後に述べる条件検討の結果により決めた。

- (1) 平底プレートに乾燥濾紙血液を3.2mmにパンチして1枚入れる
- (2) プレートに抽出溶剤50 μ lを分注する
- (3) プレートに蓋をしてコレステロールを溶出させる
- (4) コレステロール発色試薬200 μ lを分注する
- (5) 軽く振とう後すみやかに150 μ lを平底プレートへ分取する
- (6) 25 $^{\circ}$ Cで5分間静置する
- (7) 550/650nmの吸光度を測定する
- (8) コレステロール値を算出する

3. 結果

3-1 抽出溶剤の検討

抽出に用いる溶剤を決めるため、メタノール・エタノール・イソプロパノールの3種類の溶剤についてスタンダードを溶出させ(10~60分)、その吸光度を比較した。溶出時間30分の標準曲線を図2に示すが、メタノールが最も吸光度の差が大きかった。さらに成人59名の血清コレステロールとの相関関係を調べると、その相関係数rはメタノールで0.89(図3)、エタノールで0.79、イソプロパノールで0.52だった。以上より抽出にはメタノールを用いることとした。

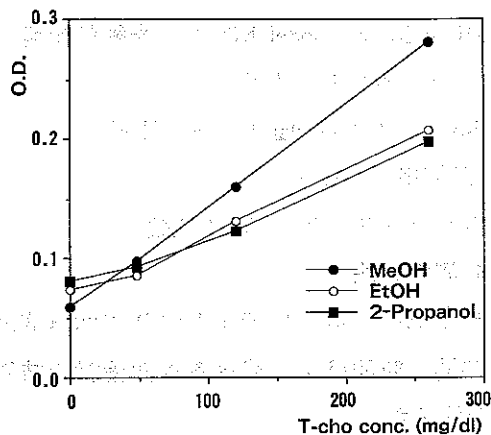


図 2 溶出時間30分における標準曲線

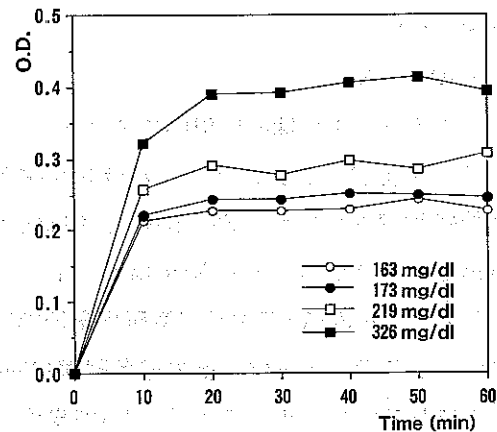


図 4 抽出時間による吸光度の変化

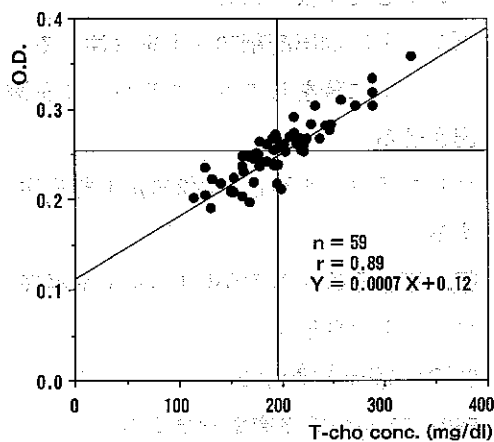


図 3 血清コレステロール値と吸光度の関係 (メタノールで溶出)

3-2 抽出時間の検討

抽出時間を決める目的で、4種類の濃度の成人血液サンプルを10分から60分まで溶出させ吸光度の変化を比較した。結果は図4に示すとおり10分ではコレステロールの濃度が高いサンプルについて、十分な抽出がなされなかったが、20分以降、ほとんど吸光度の変化が認められなかった。そこで以下は抽出の時間を30分とした。

3-3 再現性試験

測定の再現性を調べたところ表1に示すとおり良好な結果であった。

表 1 再現性

	n	mean ± S.D. (mg/dl)	C.V. (%)
Intraassay			
Sample 1	8	134.8 ± 5.2	3.8
Sample 2	8	169.9 ± 7.1	4.2
Interassay			
Sample 3	8	97.6 ± 3.2	3.2
Sample 4	8	155.8 ± 6.8	4.4

3-4 溶出の定量性

溶出の定量性を調べるため乾燥濾紙血液の量を1/4枚から3枚までを変化させ、その結果を比較した。吸光度は図5に示すとおりサンプル量に応じほぼ直線的に増加した。

3-5 最小検出感度

0の吸光度 + 2 S.D. より求めた測定感度は15mg/dlであった。

3-6 保存試験

サンプルの保存による抽出率の変化を調べるため-20、4、25、37℃で4週間保存し、その測定値の変化を求めた。結果は図6に示すとおり37℃で1ヶ月保存しても、その抽出率の低下は10%以内と大きな低下は認められなかった。

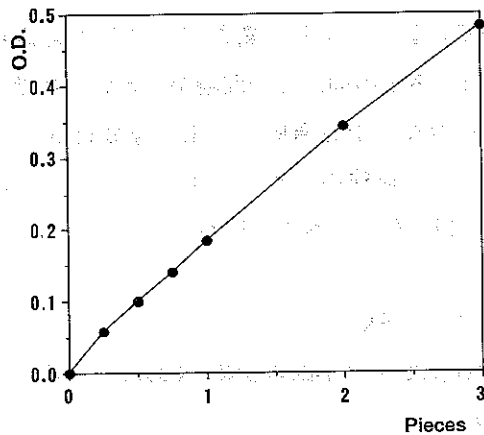


図 5 乾燥濾紙血液検体の枚数と吸光度の関係

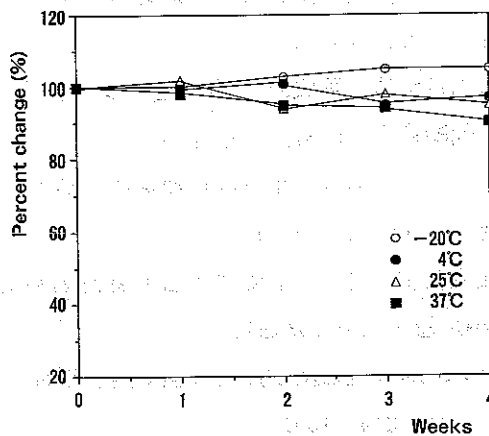


図 6 保存による抽出率の変化

3-7 生後5-7日の新生児のコレステロール値
 生後5-7日の新生児1064名のコレステロール値を測定した。値はほぼ正規分布し、その平均値は $171.1 \pm 24.3 \text{ mg/dl}$ 、男児の平均値 $168.9 \pm 24.8 \text{ mg/dl}$ ($n=526$)、女児の平均値 $173.2 \pm 23.8 \text{ mg/dl}$ ($n=479$)であった。この結果を出生時体重、在胎週数により分類したところ、表2・3のとおりだった。

3-8 生後1ヶ月の新生児のコレステロール値

生後1ヶ月の新生児381名のコレステロール値を測定した。結果はほぼ正規分布し、全体

の平均値 $132.5 \pm 22.8 \text{ mg/dl}$ 、男児の平均値 $128.9 \pm 22.1 \text{ mg/dl}$ ($n=211$)、女児の平均値 $136.9 \pm 23.0 \text{ mg/dl}$ ($n=170$)だった。

表 2 体重別新生児のコレステロール値

出生時体重	mean \pm S.D (mg/dl)	n
1500g未満	154.3 ± 12.9	3
1500g~2000g	155.7 ± 29.3	10
2000g~2500g	174.4 ± 24.2	74
2500g~3000g	171.6 ± 23.9	353
3000g~3500g	170.8 ± 24.1	472
3500g~4000g	169.8 ± 24.8	139
4000g以上	177.2 ± 26.9	13

表 3 在胎週数別新生児のコレステロール値

在胎週数	mean \pm S.D (mg/dl)	n
31週未満	150.7 ± 15.4	6
31週~34週	162.9 ± 48.9	3
34週~37週	165.4 ± 22.9	40
37週~40週	171.4 ± 23.9	639
40週以上	171.7 ± 24.9	376

4. 考 察

血清中のコレステロールの比色測定方法は古くは硫酸等を使用したLiebermann-Burchard反応やKiliani反応が主として用いられてきた。しかし現在では、強酸を用いず温和な条件で分析できる酵素法が臨床検査分野での主流となっている。酵素法で血清コレステロールを測定する市販のキットは種々販売されているが、これらは血色素の影響により乾燥濾紙血液サンプルを直接測定することができない。そこで血色素の影響を除くため、あらかじめ血色素を固定しその後コレステロールを抽出する必要がある。従来報告されている方法で

はこの固定・抽出にクロロホルムやエーテルといった人体への影響が強い溶剤を用いていた。しかし、この点は改善の必要がある。そこで操作の煩雑さや感度の改善に加え、人体への影響が緩和な抽出溶剤を用いることも考慮し検討した。その結果、メタノールが色素の固定と抽出溶剤として適当なことがわかった。次に新生児乾燥濾紙血液検体でそのコレステロール値の分布を調べた。生後1ヶ月の新生児では報告されている血清値 138 ± 34 (n=86)⁸⁾とほぼ等しい測定値が得られたが、生後5-7日目では、血清値として報告されている値 132 ± 20 (n=50)⁸⁾より高くなった。この原因として、成人は赤血球 1 mlあたり $1.06-1.34$ mgのコレステロールが含まれており⁹⁾、乾燥濾紙血液をサンプルとする場合この赤血球中のコレステロールも測定することになるが、その割合が生後5-7日の新生児では異なるからではないかと考えている。しかし、全体の平均値が高くとも、乾燥濾紙血液としての正常範囲を設定することによりこの方法でスクリーニングを行うことは可能と考えられる。

5. 結 語

乾燥濾紙血液サンプルのコレステロール測定方法について検討し、メタノールでの抽出を行う方法が乾燥濾紙血液をサンプルとしたマススクリーニング法として有用なことについて述べた。

家族性高コレステロール血症のスクリーニング時期に関しては授乳期にスクリーニングしても食事や薬物療法が難しいといったフォローの面等の問題が指摘され、食事等のコントロールが可能でかつ続発性の高コレステロール血症が増えない時期が望ましいと考え

られている。しかし、新たにシステムを組むことはコストの面からの問題が大きい。今後、これらの点を十分考慮した上で家族性高コレステロール血症のパイロットスタディについて取り組みたいと考えている。

6. 文 献

- 1) 馬淵宏他：日本医事新報，3396，11-19，1989.
- 2) 太田孝男他：平成3年度厚生省心身障害研究「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」，206-207，1991.
- 3) 藪内百治他：平成3年度厚生省心身障害研究「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」，208-210，1991.
- 4) 浅見直他：平成3年度厚生省心身障害研究「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」，211-214，1991.
- 5) 浅見直他：小児科診療，47-8，1229-1233，1986.
- 6) 藤村有信他：日本マス・スクリーニング学会誌，1-1，76，1991.
- 7) 藪内百治他：平成2年度厚生省心身障害研究「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」，177-180，1990.
- 8) 藪内百治他：昭和61年度厚生省心身障害研究「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」，171-174，1986.
- 9) Teodra Macchia et al: Clinica Chimica Acta 199, 59-68, 1991.

Measurement of Cholesterol in Dried Blood Samples

Yoko Ogiya, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu and Yuko Kikuchi

A total cholesterol assay in dried blood samples was evaluated for familial hypercholesterolemia screening

In advance, total cholesterol was extracted by methanol from dried blood samples. Then it was determined by a commercially available kit with slight modification.

The use of methanol extraction improved the result substantially. This method is sensitive enough to measure total cholesterol values in small amount of samples such as a piece of 3.2mm disc. The reproducibility is adequate for practical use. There are good correlation between cholesterol values obtained from this method and those of serum samples. Moreover, this method is easy and quick.

From these results, this method will be useful for mass screening.