

乾燥濾紙血液サンプルのLp(a)の測定

扇谷陽子 福土 勝 佐藤泰昌 菊地由生子

要 旨

LDL類似のリポタンパクであり独立した動脈硬化を促進する因子であるLp(a)を若年の心筋梗塞予防を目的とする高コレステロール血症スクリーニングに応用するため、乾燥濾紙血液をサンプルとして測定する方法について検討した。乾燥濾紙血液3.2mmディスク1枚をキット添付の希釈液で溶出し、これを血清用ELISA法キットで測定することにより、血清との相関が良好な測定ができることが判った。

1. 緒 言

Lp(a)はLDL類似のリポタンパクで、コレステロールとは独立した動脈硬化を促進する危険因子の1つとして最近注目を浴びている。個人のLp(a)値は、ほぼ一定の値をとり環境や生理的因子により殆ど変動せず、濃度の大部分が遺伝的に規定されていると考えられている。この値は食事では低下させることができないものの薬物により血中濃度の低下は可能であることが知られている¹⁾。

ところで、高コレステロール血症でかつ高Lp(a)の場合、冠動脈疾患の発生率が高いことが報告されている²⁾³⁾。このためLp(a)は、若年の心筋梗塞予防のためのスクリーニングに重要な指標と考えられる。そこで、乾燥濾紙血液のLp(a)の測定方法を検討したので報告する。

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Lp(a)の標準品(Biopool社製)及びその希釈液を添加し50 μ l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。

妊婦のサンプルは妊婦甲状腺機能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

測定にはティントエリーゼ・Lp(a)(Biopool社製)を用いた。このキットは、精製ヤギ抗アポ(a)抗体結合プレート、Tween-20含有リン酸緩衝液、青色色素含有検体希釈液、ペルオキシダ-ゼ標識抗アポ(a)抗体、発色試薬(o-フェニレンジアミン)、酵素基質(0.15%過酸化水素水)、反応停止液(3M硫酸)で構成されているサンドイッチ法を主原理としたELISA法キットで血清用として市販されている。

2-3 器具及び装置

(1)ミキサー

Micro Mixer Model MX-4(三光純薬社製)

(2)マイクロプレートリーダー

Emax (Molecular Devices 社製)

(3)計算用コンピューター

NEC PC-9801VX (NEC社製)

2-4 測定方法

測定方法は、以下に示すとおりで、血清はキット添付の希釈液で2500倍に希釈後20 μ lをサンプルとした。

- (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)プレートに希釈液250 μ lを分注する
- (3)プレートにシールをして、4 $^{\circ}$ Cで一晩抽出する
- (4)新生児サンプルはこのまま、成人のサンプルは、これをさらに2倍に希釈し、その10 μ lをサンプルとする
- (5)プレートに緩衝液100 μ lを加え1分間振とうする。
- (6)ウェルにサンプルを加える(血清20 μ l、乾燥濾紙血液抽出液10 μ l)
- (7)シールをして2時間振とうすることにより反応させる
- (8)ウェルに標識抗体液50 μ lずつ加える
- (9)シールをして1時間振とうすることにより反応させる
- (10)内溶液を除き緩衝液でプレートを4回洗浄する
- (11)各ウェルに発色試薬200 μ lずつ分注し遮光下20分反応させる
- (12)各ウェルに停止液50 μ lずつ加え振とう後492/650nmの吸光度を測定する
- (13)検量線より測定値を算出する

3. 結 果

3-1 標準曲線

標準曲線は、図1に示すとおり最高濃度の31.6mg/dlまでほぼ直線を示した。

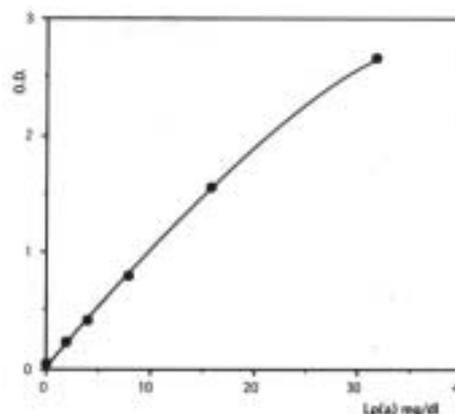


図 1 標準曲線

3-2 保存安定性

4種類の濃度の成人乾燥濾紙血液検体を-20、4、25 $^{\circ}$ Cで2ヶ月間保存し、その吸光度の違いを比較した。結果を表1に示すが、その低下は4 $^{\circ}$ Cと25 $^{\circ}$ Cではほぼ同様だった。

表1 Lp(a)の保存安定性

血清濃度 (mg/dl)	-20 保存 (O.D.)	4 保存 (O.D.)	25 保存 (O.D.)
3.13	0.696	0.483	0.379
9.97	1.929	0.660	0.604
21.55	2.768	1.062	1.034
31.26	3.198	2.447	2.314

3-3 血清との相関

成人21名の血清と乾燥濾紙血液をサンプルとし、その値を比較した。結果は図2に示すとおりで、血清の平均値 \pm S.D.は11.89 \pm 7.80mg/dl、乾燥濾紙血液で13.66 \pm 8.57mg/dlで両者は相関係数 $r=0.97$ の良好な相関関係を示した。

3-4 成人の分布

この方法での正常値を求める目的で成人の検査を行った。成人40名の血清Lp(a)の分布は、図3に示すとおりでその平均値 \pm S.D.は12.17 \pm 7.88mg/dl、乾燥濾紙血液35名では12.92 \pm 8.27mg/dlでほぼ同様の分布で

あった。

3-5 新生児サンプルの分布

新生児35名の乾燥濾紙血液測定値の分布は、図4に示すとおりで、その平均値±S.D.は2.99±3.04mg/dlであった。

3-7 母子のLp(a)値

双子2組を含む7組の母子についてそのLp(a)値を測定したところ結果は表3のとおりであった。

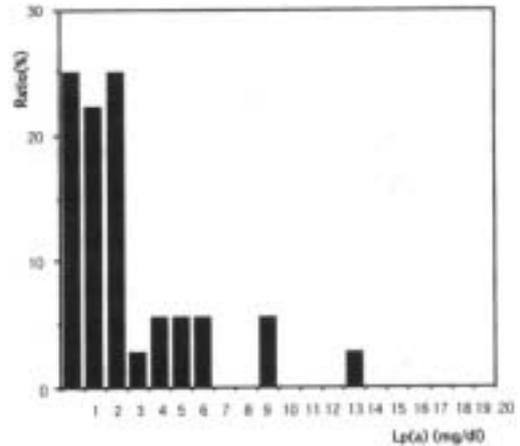


図4 新生児サンプルの分布

3-6 生後5-7日と1ヶ月のLp(a)値

3名の新生児について生後5-7日目と1ヶ月後のLp(a)値を測定したところ結果は表2のとおりであった。

表2 生後5-7日と1ヶ月のLp(a)値

No.	生後5-7日 Lp(a)(mg/dl)	生後1ヶ月 Lp(a)(mg/dl)
1	0.14	0.10
2	1.30	2.81
3	1.94	2.17

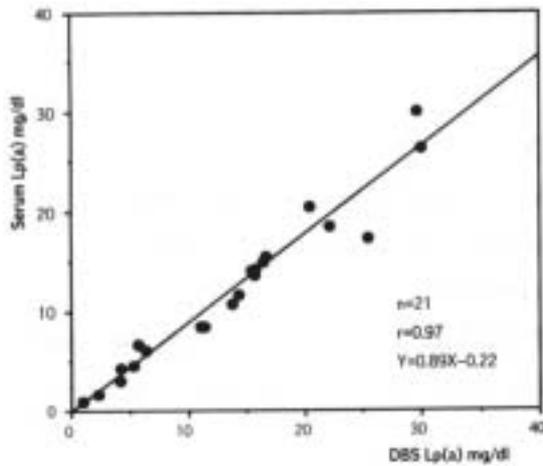


図2 血清と乾燥濾紙血液の相関関係

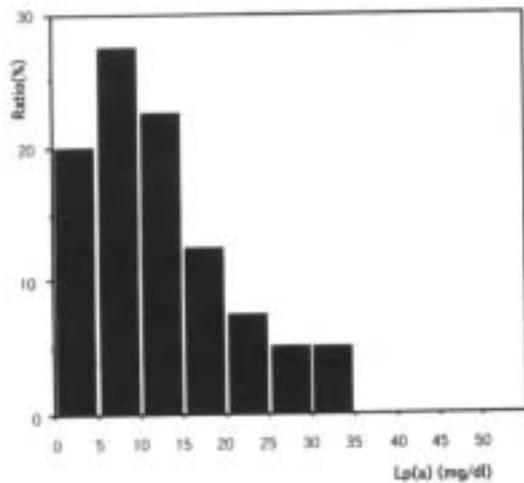


図3 成人サンプルの分布

表3 母子のLp(a)値

No.	母の採血時 妊娠週数(週)	母のLp(a) (mg/dl)	児のLp(a) (mg/dl)
1.	10	1.86	3.17
	"	"	5.82
2.	10	5.83	4.45
	"	"	5.37
3.	8	10.7	6.74
4.	12	4.41	0.29
5.	11	7.08	0.64
6.	7	13.31	6.40
7.	9	9.29	1.79

4. 考 察

血清測定用の市販のLp(a)測定キットは免疫比濁法(TIA)、ラテックス凝集比濁法(LIA)、ELISA法等の試薬がある。その中でELISA法が最も高感度である。キットの選択にあたって、日本人のLp(a)は高濃度から低濃度まで幅広い分布を示しその値は低濃度側に多い分布を示すこと、この値は年齢にはあまり影響を受けないものの新生児では低濃度にシフトしていること、乾燥濾紙血液をサンプルとするとサンプルの絶対量が少ないこと、TIAやLIAでは血色素や濾紙くずの干渉が予想されることを考慮しELISA法により検討を行った。その結果、この方法では単に希釈液で溶出する操作を加えるだけで血清と良好な相関のある測定が可能なが判った。

そこで、次にこの方法で測定した際の成人と新生児の分布を比較した。この結果、血清で報告されている³⁾⁴⁾と同様の傾向を示し、血球成分の未熟な新生児検体も測定できると考えられた。小数ながら生後5-7日と1ヶ月で比較した結果は、この間の増加がわずかであることを示した。

昨年報告した乾燥濾紙血液の総コレステロール測定法と本方法を組み合わせることで、若年で心筋梗塞を起すリスクがより高い児をスクリーニングすることができる。さらに乾燥濾紙血液は少量の採血で済み、サンプルの採取や運搬が簡便なため、親子の値の関連(今回は父親の血液の採血ができなかった

め参考までに母子の値を記載)や、Lp(a)値に変動がある妊娠中の値の推移とホルモン値の関係など、多数の継続的推移を調査するのに適し、現在解明されつつあるLp(a)の作用について多くの情報を得ることができると考えられる。

5. 結 語

乾燥濾紙血液サンプルのLp(a)測定方法について検討し、市販の血清測定用ELISA法試薬で簡便に測定できることが判った。昨年報告した乾燥濾紙血液をサンプルとした血液中総コレステロール測定方法でスクリーニングした高コレステロール血症児について本方法でLp(a)値を測定すれば、若年で心筋梗塞を起すリスクがより高い児をスクリーニングできると考える。

6. 文 献

- 1)梶山梧朗:総合臨床,43-5,920-923, 1994.
- 2)Seed M, et al : N Engl J Med, 322, 1494-1499,1990.
- 3)野間昭夫:医学のあゆみ,168-11,995- 1002, 1994.
- 4)Nader Rifai, et al : Atherosclerosis, 92, 123-129, 1992.

Measurement of Lp(a) in Dried Blood Samples

Yoko Ogiya, Masaru Fukushi, Yasumasa Satou and Yuko Kikuchi

A Lp(a) assay in dried blood samples was evaluated for hypercholesterolemia screening. In advance, sample is extracted by sample diluent. Then it was determined by a commercially available kit with slight modification.

This method is sensitive enough to measure samples of 3.2mm disc. There are good correlation between Lp(a) values obtained from this method and those of serum samples.

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