

血清セルロプラスミンの定量分析法に関する研究

1. 血清セルロプラスミン測定に利用される Ferrous oxidase 反応と Diamine oxidase 反応の比較

下 里 文 子*

大 迫 優 子*

塩 原 知 恵*

はじめに

血清中のセルロプラスミン (Ceruloplasmin, Cp) は、分子量151,000、分子中に銅数原子 (8原子) を含む青色のタンパクで、ウィルソン氏病など先天的に Cp を欠損している例を除いては、一般に血清中銅の95%が Cp 中に存在し、Cp の増減はそのまま血清銅の変動を反映しているとみられている。

この Cp の測定には免疫学的方法 (SRID など)、Cp そのものの持つ青色を比色 (脱色前後の吸光度変化の測定) して求める方法、Cp の持つ酸化還元触媒活性を測定して求める方法などがあるが、感度、精度の点からp-フェニレンジアミン (PPD)、N, N-ジメチル p-フェニレンジアミン、ベンチジンなどを基質とするいわゆるジアミンオキシダーゼ活性測定が最も広く用いられている。中でも PPD を基質とする方法 (PPD 法) は最もポピュラーに利用されてきた。

最近、Cp のフェロースオキシダーゼ活性によりフェロセン (biscyclopentadiethyliron, Fe^{2+}) を酸化し、生ずるフェリシウムイオン、 Fe^{3+} でロイコ色原体 BCMA を酸化し、得られる最大吸収波長 755nm の色素を測定する方法が見い出され、試薬キットとして登場した (フェロセン法)。

今回セルロプラスミンの定量分析に関する一連の研究の一環として、このセルロプラスミン測定用試薬キットについて、PPD を基質とする従来法と対比しながら、その基本的性質およびキットに添付されている標準血清について検討し、この方法による参照値 (正常値) も求めたので報告する。

方 法

比色分析にはロシュ社製自動分析器 COBAS BIO を、血清銅の原子吸光分析には日立 518型デジタル原子吸光光度計を用いた。フェロセン法の試薬キットデタミナー Cp (協和メディクス) の組成およびキットに示された操作方法は表 1, 2 に示した。また COBAS

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

表1 デタミンナー Cp の組成

試薬	1 (R-1)	(前処理剤)	0.1M 酢酸緩衝液 pH5.0 還元性物質処理剤 界面活性剤
試薬	2 (R-2)	A-2 (発色剤) B-2 (A-2 溶解液)	BCMA, 安定化剤 1 mM グッド緩衝液 pH7.0 フェロセン, 界面活性剤
標準血清		32U/l (42.6mg/dl)	

表2 キットに示された測定操作方法

	検体	標準液	盲検
R-1	1.5	1.5	1.5 (ml)
試料	0.03	0.03	0.03
	37°C	1~5分間加温	
R-2	1.5	1.5	1.5
5~10分後 755nmにおける 吸光度変化 (ΔA_b) を測定する。			

BIO で測定するために、検体、試薬とも採取量を縮小して行った。

なお、Cp のオキソダーゼ作用を発色反応でとらえようとする場合、lag phase が認められるのが普通であるが、このキット化された試薬の場合、検体（血清）をまず第1試薬に混じて検体に混在する還元性物質（lag phase をもたらしもの）を酸化してから、主反応試薬（第2試薬）を添加するようになっている。

また PPD 法の試薬として 50mM PPD/0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いた。

Ex.-1) 還元性物質量と lag time の関係

検体は、健常者血清およびこれにアスコルビン酸を 5.9, 14.6, 29.6, 96.2mg/dl になるように添加した血清 (As-1, As-2, As-3, As-4) を用いた。試薬は第1試薬 (R-1) と第2試薬 (発色剤 A-2 を溶解液 B-2 の 40ml で溶解、すなわち、規定の2.125倍の濃度とした) を 2:1 の混液とし、表3に示すように血清 10 μ l に対して 180 μ l 加え、混和5秒後から30秒間隔で10分間の吸光度変化をみた。

Ex.-2) 反応混液中の検体量と lag time および活性値の関係

反応混液中の検体量を原法の5倍量にまで増加させて、lag time および活性値に差が生じるかどうかをみた。検体は、比較的 lag phase の大きい患者血清を用い、反応条件は表4に示した。第2試薬は、原法より2.125倍濃度が高いため、加える量は第1試薬の半量である。

Ex.-3) 第1試薬による前処理の lag phase に対する効果の検討

第1試薬による還元性物質消去の効果をみるために、前処理時間を1分、3分、5分とった後第2試薬を加えてからの吸光度変化をみた。反応条件は表5に示す。

Ex.-4) 基質濃度と反応速度の関係

表3 Ex.-1 の反応条件

PARAMETER LISTING	
1 UNITS	MG/DL
2 CALCULATION FACTOR	0
3 STANDARD 1 CONC	42.6
4 STANDARD 2 CONC	42.6
5 STANDARD 3 CONC	0
6 LIMIT	0
7 TEMPERATURE [DEG. C]	37.0
8 TYPE OF ANALYSIS	2
9 WAVELENGTH [NM]	750
10 SAMPLE VOLUME [UL]	10
11 DILUENT VOLUME [UL]	20
12 REAGENT VOLUME [UL]	180
13 INCUBATION TIME [SEC]	0
14 START REAGENT VOLUME [UL]	0
15 TIME OF FIRST READING [SEC]	5.0
16 TIME INTERVAL [SEC]	30
17 NUMBER OF READINGS	20
18 BLANKING MODE	1
19 PRINTOUT MODE	3

表4 Ex.-2 の反応条件

PARAMETER LISTING	
1 UNITS	MG/DL
2 CALCULATION FACTOR	0
3 STANDARD 1 CONC	42.6
4 STANDARD 2 CONC	42.6
5 STANDARD 3 CONC	0
6 LIMIT	0
7 TEMPERATURE [DEG. C]	37.0
8 TYPE OF ANALYSIS	3
9 WAVELENGTH [NM]	750
10 SAMPLE VOLUME [UL]	03, 10
11 DILUENT VOLUME [UL]	20
12 REAGENT VOLUME [UL]	120
13 INCUBATION TIME [SEC]	180
14 START REAGENT VOLUME [UL]	60
15 TIME OF FIRST READING [SEC]	5.0
16 TIME INTERVAL [SEC]	30
17 NUMBER OF READINGS	20
18 BLANKING MODE	1
19 PRINTOUT MODE	3

健常者血清を用いて、第2試薬を原液濃度の1.25, 1, 2/3, 1/3, 1/6, 1/12倍になるように加え、酵素反応速度の変化をみた。前処理時間はEx.-3の結果から1分とし、その他の反応条件は表5と同様である。

Ex.-5) 標準液に含まれている oxidant 様物質消去に関する検討

表5 Ex.-3 の反応条件

PARAMETER LISTING	
1 UNITS	MG/DL
2 CALCULATION FACTOR	0
3 STANDARD 1 CONC	42,6
4 STANDARD 2 CONC	42,6
5 STANDARD 3 CONC	0
6 LIMIT	0
7 TEMPERATURE [DEG, C]	37,0
8 TYPE OF ANALYSIS	3
9 WAVELENGTH [NM]	750
10 SAMPLE VOLUME [UL]	10
11 DILUENT VOLUME [UL]	20
12 REAGENT VOLUME [UL]	120
13 INCUBATION TIME [SEC]	60, 180, 300
14 START REAGENT VOLUME [UL]	60
15 TIME OF FIRST READING [SEC]	5,0
16 TIME INTERVAL [SEC]	30
17 NUMBER OF READINGS	20
18 BLANKING MODE	1
19 PRINTOUT MODE	3

標準液にアスコルビン酸を 1.9, 4.2mg/dl になるように加え、それによる直線性の変化(改善)を検討した。反応条件は Ex.-4 と同様である。

Ex.-6) C_p のジアミノオキシダーゼ活性とフェロースオキシダーゼ活性に対するアジ化ナトリウム (NaN_3) の阻害効果の比較

PPD 法, フェロセン法ともに終濃度が0.1, 0.5%となるように NaN_3 を基質試薬に添加し, 検体は健常者血清とキット添付の標準血清, および妊婦血清(健常者の約2倍値)を用いた。

PPD 法では検体 $20\mu l$ に試薬 $200\mu l$ を加え, 5分間加温の後, 530nm における吸光度変化を15分間測定し, 活性を求めた。フェロセン法の反応条件は Ex.-4 と同様である。

Ex.-7) 参照値

健常者血清81例(男子38例, 女子43例)について測定した。Ex.-5 の結果から標準液にはアスコルビン酸を 2.5mg/dl となるように添加し, 前処理時間は3分とって第2試薬を加え, 混和3分後から1分間隔で5分間の直線部分の Δ absorbance を測定した。その他の反応条件は表5と同様である。

Ex.-8) 血清銅との相関

Ex.-7 で用いた血清について, 原子吸光法で血清銅を定量し, C_p との相関をみた。

結 果

Ex.-1) 健常者血清の lag time は3~7分であったが, アスコルビン酸添加血清では10分後にも直線性はみられなかった(図1)。

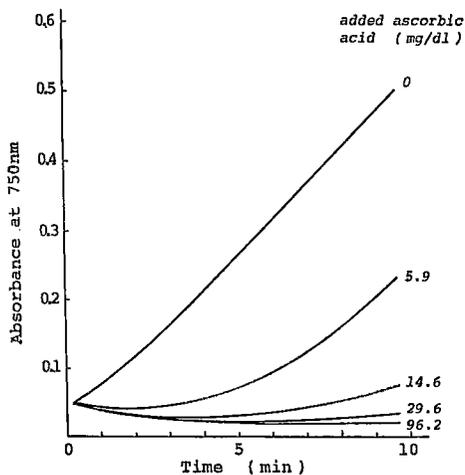


Fig. 1. Effect of a reducing agent on lag time. (Ascorbic acid was added to serum as a reducing agent.)

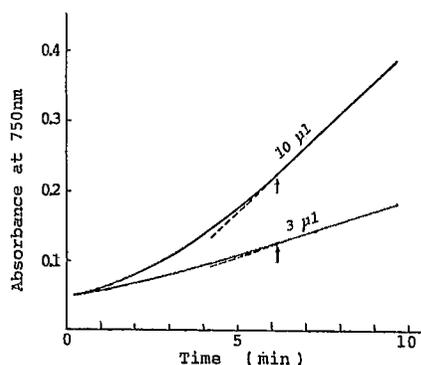


Fig. 2. Relation between sample volume and lag time.

表6 第1試薬による前処理時間と lag time 消去効果

前処理時間 (分)	0	1	3	5
試料				
健常者血清	3~7	0	0	0
As-1	>10	6	4	2
As-2	>10	>10	6	5
As-3	>10	>10	8	7
As-4	>10	>10	>10	>10

単位：分

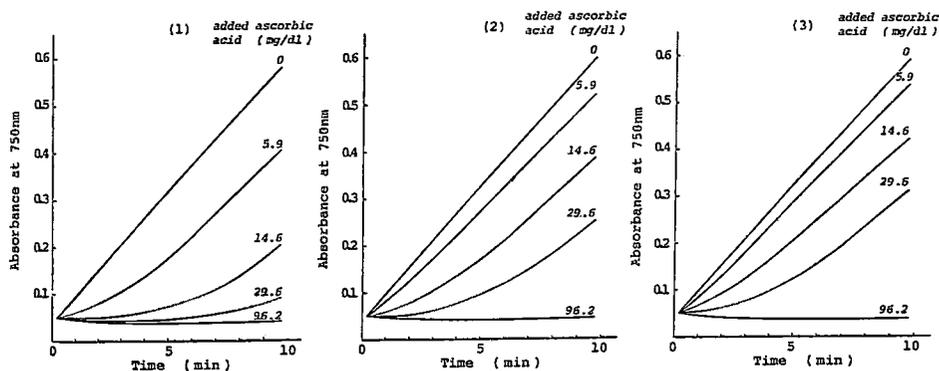


Fig. 3. Effect of pretreatment with reagent 1 on lag time.

- (1) Preincubation time 1 minute.
- (2) Preincubation time 3 minutes.
- (3) Preincubation time 5 minutes.

Ex.-2) 反応混液中の検体量は、図2に示すように lag time にはほとんど影響を与えなかった。また活性値(標準液との相対活性)も原法で 20.32mg/dl が5倍量で 20.34 mg/dl となり、ほとんど差が認められなかった。

Ex.-3) 第1試薬による lag time 消去は、表6および図3に示すように第1試薬に

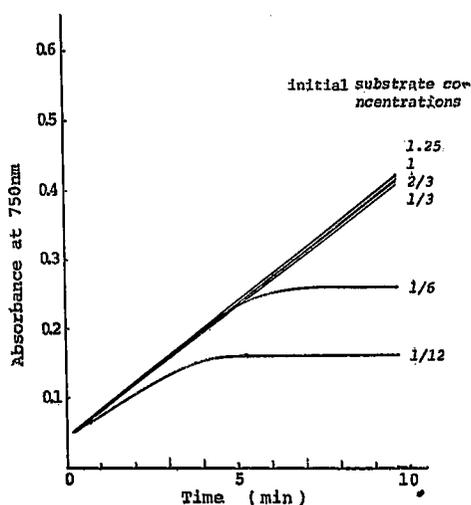


Fig. 4. Relation between the initial concentration of substrate and time course of reaction velocity.

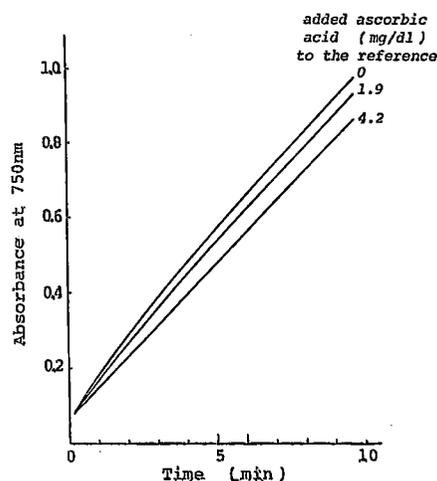


Fig. 5. Effect of a reducing agent on linearization of standard curve.

よる前処理時間依存性を示し、1分の前処理で健常者血清は約0分、As-1（アスコルビン酸 5.9mg/dl 添加血清）は約6分に、3分の前処理で As-1 は約4分、As-2（アスコルビン酸 14.6mg/dl 添加血清）は約6分、As-3（アスコルビン酸 29.6mg/dl 添加血清）は約8分にと、5分の前処理で As-1 は約2分、As-2 は約5分、As-3 は約7分にと、それぞれ lag time の短縮がみられた。しかし As-4（アスコルビン酸 96.2mg/dl 添加血清）は前処理5分でも依然として10分以上の lag time を残していた。

Ex.-4) 基質濃度と反応速度の関係は、図4に示すように原液の1/3までは速度および10分までの直線性に差を示さなかった。1/6は反応初期での速度は原液と差がみられなかったが、4分で反応速度が低下しはじめた。また1/12は反応初期からすでに速度低下が認められた。

Ex.-5) 標準液中の oxidant 様物質については、図5に示すように 2~4 mg/dl のアスコルビン酸添加で反応初期から直線化され、著明に効果のあることが認められた。

Ex.-6) Cp のジアミノオキシダーゼ活性とフェロースオキシダーゼ活性に対するアジ化ナトリウム (NaN_3) の阻害効果についてはジアミノオキシダーゼは完全に失活したが、フェロースオキシダーゼの失活は不完全で、その原活性と残存活性の相関性は図6に示すように不明確であった。なおその中で標準液は一般の血清よりも失活の度合いが大きかった（図中×で表示）。

Ex.-7) 健常者の血清中セルプラスミン濃度は、下記のようになった。

セルプラスミン	mean \pm SD (mg/dl)
男子 (38名)	24.7 \pm 3.5
女子 (43名)	26.8 \pm 3.5
総合 (81名)	25.8 \pm 3.7

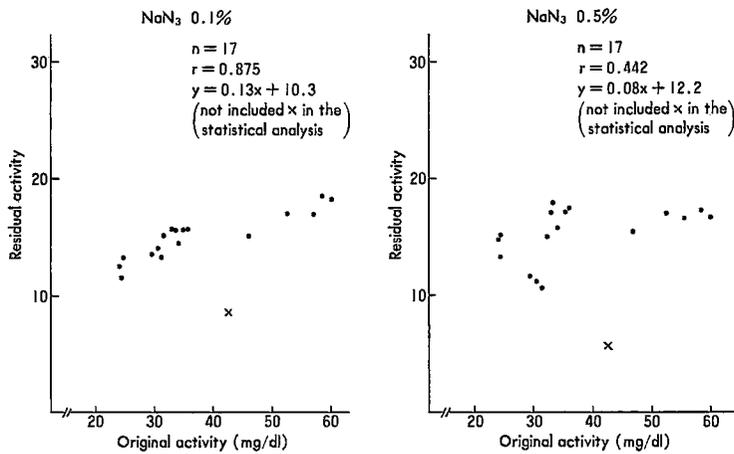


Fig. 6. Correlation between the original activity and residual activity after NaN_3 treatment. (with the Ferrocene method)

Ex.-8) 血清銅と血清セルロプラスミン濃度の関係は、下記のようになった (図7)。

銅	mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
男子 (38名)	90.1 \pm 11.2
女子 (43名)	95.4 \pm 11.8
総合 (81名)	92.9 \pm 11.8

相関係数 r および回帰直線	
男子 (38名)	r = 0.915 y = 0.286x - 1.12
女子 (43名)	r = 0.948 y = 0.281x + 0.01
総合 (81名)	r = 0.935 y = 0.289x - 1.05

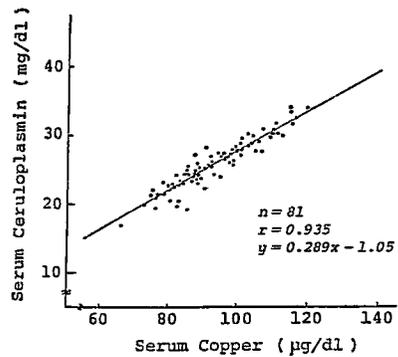


Fig. 7. Correlation between copper and ceruloplasmin in serum.

考 察

生体試料中セルロプラスミンの測定法のうち、セルロプラスミンの酸化触媒活性 (diamine oxidase または ferrous oxidase 作用など) を利用するものでは、一般にその初期反応における lag phase の消去についての考慮が必要とされていた。^{1)~7)} この lag phase は、試料中に共存する SH 化合物やアスコルビン酸などの還元性物質 (Hydrogen donor) に由来すると考えられ、Sunderman らは試料と基質を混和後、37°C に約5分放置してセルロプラスミンの作用による還元性物質の消化を待って、吸光度変化の測定 (Δ absorbance の測定) をスタートさせる手法 (実際には、ここで試料ブランク用試験管にアジ化ナトリウムを添加して反応を停止させる) をとっている。⁷⁾

今回検討したデタミナー Cp は、試料中に含まれる、これら還元性物質を消去するための試薬 R-1 が組み込まれていて、測定時にまずこの R-1 を試料に加え、1～5分37°Cに放置（前処理）した後に、基質（R-2）を加え更に5分間待ってから、次の5分間に Δ absorbance を測定する（操作法—1）か、同様に R-1 による前処理の後、基質（R-2）を加えた直後から10分間の Δ abs. を測定する（操作法—2）かの、2種の操作法が指定されている。しかし、われわれの検討結果では、表6に示したように、健常者血清の場合は1分間の前処理でほぼ lag phase の消去ができて、操作法—1または2の利用が可能であると認められたが、6 mg/dl 程度にビタミンCを含む血清では、3分以下の前処理では指定されている操作法（1，2）のいずれもが適正を欠く、と言わざるを得ないものであった。従って、R-1 の組成は、更に改善することが必要であろう。

次に、基質濃度については、原法の3倍希釈までほとんど反応速度に変化が認められないことから、十分なものと考えられるが、添付されている標準液については、図5に示したように基質を加えた直後から反応初期の数分間、一般の血清試料に見られる lag phase とは逆の形（反応の初期ほど反応速度が速い）を示し、この標準液中に過酸化物が含まれていることを示唆している。これに対する策としては図5に示したようにアスコルビン酸の添加が有効であった。なお、この過酸化物を含む標準液をそのまま用いる場合は、試料中セルロプラスミンの測定値を、わずかではあるが負に傾ける可能性を有するものと考えらるべきであろう。

この標準液にアスコルビン酸を 2.5mg/dl 添加し、測定操作を若干改善して lag phase を十分に消去して測定した健常者81名（男子38名，女子43名）の参照値は、男子 24.7 ± 3.5 ，女子 26.8 ± 3.5 ，総合で 25.8 ± 3.7 mg/dl であった。

一方、Ex.-6 でオキシダーゼ活性阻害剤 NaN_3 による阻害効果が PPD 法でほぼ完全な阻害がみられたのに対し、フェロセン法でその阻害が不完全であり、かつ残存活性と原活性の間の相関性がかなりとぼしいことは極めて興味深いことで、まず最初の疑問は、フェロセン法で NaN_3 添加後に残存している活性ははたして Cp による反応であるのか？、もしそうでないとするなら何によるものか？ ということであるが Ex.-8 で行ったフェロセン法による Cp と血清銅との相関（図7）が極めて良いことから、フェロセンで測定しているものが間違いなく Cp のオキシダーゼ活性であることを裏づけていると言わざるを得ない。従ってこの不完全な阻害は、フェロセン法の基質およびカップルされている発色系を含めた全システムの酸化・還元ポテンシャルが、PPD 法におけるそれと異っているために、 NaN_3 による阻害がかかりにくいのかもしれないと考えられる。従って、 NaN_3 による阻害のメカニズムを理解する上で有用な情報といって良いのではないかと思われる。ただ、それにしてもフェロセン法における残存活性の多少を左右している因子については、別の面で依然としてそれが何であるのか興味が残るため、継続して研究の対象にして行く予定である。

文 献

- 1) Humoller, F.L. et al: Determination of plasma amine oxidase activity. Clin. Chem. 4 : 1, 1958
- 2) Henry, R.J. et al: Determination of ceruloplasmin oxidase in serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104 : 620, 1960
- 3) Ravin, H. A.: An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. J. Lab. Clin. Med. 58 : 161, 1961
- 4) Colombo, J.P. and Richterich, R.: Zur Bestimmung des Cäruloplasmins im Plasma. Schweiz. Med. Wschr. 21 : 715, 1964
- 5) Cox, D. W.: Factors influencing serum ceruloplasmin levels in normal individuals. J. Lab. Clin. Med. 68 : 893, 1966
- 6) Morell, A. G. et al: Measurement of the concentration of ceruloplasmin in serum by determination of its oxidase activity. In Laboratory Diagnosis of Liver Diseases; Sunderman & Sunderman, Jr. Eds. W.H. Green, Inc., St. Louis, Mo., 1968, p.193
- 7) Sunderman, F.W., Jr., Nomoto, S.: Measurment of human serum ceruloplasmin by its p-Phenylenediamin oxidase activity. Clin. Chem. 16 : 903, 1970

(1984年9月30日 受付)