

## 血清セルロプラスミンの定量分析法に関する研究

### 2. 血清セルロプラスミンの生理的日内変動および性差と血清採取後の保存に関する検討

下 里 文 子\*  
大 迫 優 子\*  
塩 原 知 恵\*

#### はじめに

臨床化学分析においては、各項目別に目的物質の生理的日内変動と試料採取後の安定性、保存法に関する情報の把握が必須とされている。Cp に関するこれらの情報源としては、国内では清水らによる次のようなものが今のところ最もポピュラーなものと考えられる。<sup>1), 2)</sup>

1. 性差はない。
2. 新生児は低値で、1年以内に成人の値に達する。
3. 日内変動があり、夜間から早朝にかけて最も低く（平均の8%減）、日中高値（平均の約5%増）で午後低下し、夕方5時頃には3~7 mg/dl 低くなる。
4. 保存性は、冷凍下でも銅の遊離があり、oxidase 活性が低下するから、1週間以内に測定する。

しかしながらこれらのうち、原著論文の引用が明らかなのは新生児の低値に関するものだけで、他の項に関しては不明である。そこで今回これらに関する追試のための確認実験を行うことにした。

#### 材料および方法

吸光度測定装置にはロシュ社製自動分析器 COBAS BIO を、検体は健常者血清と、キット添付標準血清を、試薬は PPD 法には 50mM PPD/0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、フェロセン法にはセルロプラスミン測定用試薬キットデタミナー Cp (協和メディクス) を使用した。

測定法は PPD 法では検体 20 $\mu$ l と試薬 200 $\mu$ l を混和し、5分後から 530nm における吸光度変化を読み始め、約5分間測定した。フェロセン法では検体 10 $\mu$ l と第1試薬 120 $\mu$ l を混和し、前処理時間を3分とった後、第2試薬 60 $\mu$ l を加え、その後5分間の 750nm における吸光度変化から Cp の活性を求めた。

#### 1. 試料の保存と安定性に関する検討

\* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

## 1) EDTA の影響

抗凝固剤として一般的に用いられている EDTA を、検体（血清）に 1～6 mg/ml 添加し、その前後の活性を PPD 法とフェロセン法で測定した。

## 2) 凍結、融解を繰り返した場合の失活および 6 か月間凍結保存後の失活の検討

2 種の検体について凍結、融解を 3 回繰り返し、凍結前と 3 回目の融解後の活性値をフェロセン法で比較した。またプール血清の凍結前の活性値とその  $-20^{\circ}\text{C}$  凍結 6 か月後の活性値を PPD 法で比較した。

## 2. 生理的日内変動に関する検討（採血時間の選択）

健常者 13 例について早朝（7 時 30 分頃）、午前中（10 時 30 分）、夕方（16 時 30 分）の 3 回採血し、フェロセン法で活性を測定した。

## 3. 性別差に関する検討

健常者男子 38 例、女子 55 例より採取した血清について、フェロセン法で測定し、比較した。

## 結 果

1. 1) EDTA 添加後の残存活性は、PPD 法が 90～88%、フェロセン法が 97～96% で、血清 1 ml に対する添加量が 1 mg と 6 mg の間にその残存活性の上ではほとんど差が認められなかった。

2) 凍結、融解を繰り返した場合およびプール血清についての  $-20^{\circ}\text{C}$  凍結 6 か月保

表 1 生理的日内変動 (n=13, 数値は mg/dl)

No.	早 朝 (7 時 30 分)	午 前 (10 時 30 分)	夕 方 (16 時 30 分)	No.	早 朝 (7 時 30 分)	午 前 (10 時 30 分)	夕 方 (16 時 30 分)
1	24.4	26.5	27.4	8	32.3	33.8	36.0
	24.7	26.3	27.2		33.6	34.6	35.8
2	29.3	31.0	30.9	9	35.4	40.7	39.8
	29.3	30.7	31.2		36.5	41.6	39.0
3	30.4	30.7	31.0	10	34.1	35.7	34.8
	30.8	31.5	31.3		34.1	36.0	34.9
4	31.0	31.1	29.7	11	23.9	24.8	28.7
	31.3	30.6	29.8		24.4	25.3	28.8
5	24.8	25.1	25.6	12	36.3	37.5	38.8
	24.2	25.1	25.2		34.6	37.5	39.7
6	32.7	34.1	32.6	13	23.3	20.6	24.1
	33.0	34.8	33.5		23.6	20.7	24.3
7	31.9	32.9	34.7	mean ±SD	30.1±4.4	31.3±5.6	31.9±4.8
	32.9	33.5	35.7				

存での失活は、ともに1%以下の危険率で有意の差を示さず、失活はなかったものと判定した。

2. 生理的日内変動は表1に示すように、健常者13例の平均値が、早朝(7時30分頃)  $30.1 \pm 4.4$ , 午前中(10時30分)  $31.3 \pm 5.6$ , 夕方(16時30分)  $31.9 \pm 4.8 \text{mg/dl}$  で、朝から夕方へ向かって若干の上昇(朝から昼で約4%, 昼から夕方で2%)を示している。この13例を個々の動きで検討すると、朝から昼へ、また昼から夕方へ向かってわずかでも上昇を示したものが6例、不変のものが5例、一旦上昇して再び元の値に戻ったものが1例、一旦下降した後元の値に戻ったものが1例であった。これらを統計処理した結果は、朝と昼の間では5%以下の危険率で有意に上昇しており、昼と夕方の間では有意差は認められないとするものであった。

3. 性別差は、男子  $24.7 \pm 3.5$ , 女子  $27.6 \pm 4.0$  で、1%以下の危険率で有意に女性が高値を示した。

## 考 察

この実験は、検体の採取時間と保存が測定値にどのように影響するかということに関する情報を確認する目的でなされたものである。まず初めの日内変動については、5%以下の危険率で早朝より日中が高値(平均値で約4%高値)で、日中から夕方へ向かっては推計学的な有意差にはならなかったが、平均値で若干上昇(約2%)していてこれまで一般に示されていた早朝より日中が高いという点では同じ傾向であったが、夕方に低値ということ<sup>3)</sup>では異なるため、今後も例数を多くして観察する必要がある。ただ血中のセルロプラスミンそのものがストレスによって変動する可能性を持つものであるため、採血時におこりがちな被検者への刺激を極力さけて実施することが重要で、今回の実験でも被検者が学生であり、採血の実習を兼ねて採取されたため、たまたま採血時に刺激の大きかった例も含まれていたものと思われる、今後の実験ではこの点を特に注意して実施することを考えている。

次に性差については、すでに女性が高値という報告があり、<sup>4)</sup> われわれの結果もこれと一致するもので、一般には成人では女性のほうが高値とみるべきであろう。

また凍結により失活するという点も、今回は全く認められなかったことから、セルロプラスミンのオキシダーゼ活性は、凍結によってもかなり長期間保存できるものと考えられる。

EDTA については EDTA により銅が遊離されてアポ-セルロプラスミンになりオキシダーゼ活性は失われるという考え方は、必ずしも正しくはないと言えよう。ただこの場合の若干の失活が何によるものか、またその失活の程度に PPD 法とフェロセン法とで差を示したことは、すでに第1報でとり上げた  $\text{NaN}_3$  による失活の違いとも合わせて興味深い現象であり、今後の研究対象のひとつとして考えてゆきたい。

## ま と め

血清中セルロプラスミン濃度は、そのオキシダーゼ活性で測定する場合、生理的日内変動は必ずしも著明ではなく、従って採血時間による変化には、あまりこだわらなくてもよいものと考えられる。

血清に分離してからの保存には、一般には 4 °C で 1 週間は可能であり、長期保存には -20 °C 凍結を用いることができる。

EDTA により若干失活されるが、PPD 法では約 10%，フェロセン法では 3～4 % 程度である。

性差があり、成人では女性が若干高値を示す。

## 文 献

- 1) 清水盈行：銅およびセルロプラスミン。日本臨床，春季増刊：748～274，1980
- 2) 清水盈行：銅。日本臨床，秋季増刊：411～415，1982
- 3) Vallee, B. L., Metabolism 1 : 420, 1954
- 4) Carlwright, G. E.: Symposium on Copper Metabolism. (W.D. McElroy and B. Gloss, eds.), p.274, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1950

(1984年9月30日 受付)