

《ノート》

RIA による血清ネオプテリン測定の基礎的, 臨床的検討

Basic and Clinical Studies of Measurement of Serum Neopterin Concentrations Utilizing Radioimmunoassay

坂本 正文* 山本 英明* 荒井 孝* 池井 勝美*
橋本 宏* 関 孝** 大石 勉** 城 宏輔**

Masafumi SAKAMOTO*, Hideaki YAMAMOTO*, Takashi ARAI*, Katsumi IKEI*,
Hiroshi HASHIMOTO*, Takashi SEKI**, Tsutomu OHISHI**, Kosuke JOH**

*Department of Radiology, **Division of Infectious Diseases, Immunology and Allergy,
Saitama Children's Medical Center

I. はじめに

ネオプテリンは, 分子量 253 の 2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン誘導体の 1 つで, 核酸 (GTP) 由来の補酵素 (ビオプテリン) の前駆体である¹⁾. 当初ビオプテリン欠損に基づく非典型的フェニルケトン尿症 (atypical phenylketonuria) にて測定されたが²⁾, インビトロの実験において, T 細胞由来の γ -インターフェロン (γ -IFN) によりマクロファージが活性化された時に放出される³⁾ ことなどより細胞性免疫反応を反映すると考えられ⁴⁾, 感染症^{5,6)}, 悪性腫瘍^{5,7)}, 自己免疫疾患⁸⁾, 臓器移植の拒絶反応⁹⁾, 後天性免疫不全症候群 (AIDS)⁴⁾ などの診断や経過観察に用いられている. 従来測定法は HPLC 法による尿中測定¹⁰⁾ が主であったが, RIA 法の開発により血中測定¹¹⁾ も可能となってきた. 今回著者らは RIA 法により, 血清ネオプテリンについて基礎的検討および小児領域での正常値並びに臨床的意義について検討を行った.

* 埼玉県立小児医療センター放射線部

** 同 感染免疫アレルギー科
受付: 2 年 3 月 16 日

最終稿受付: 2 年 5 月 14 日

別刷請求先: 埼玉県岩槻市馬込 2100 (☎ 339)

埼玉県立小児医療センター放射線部

坂 本 正 文

II. 方 法

1. 測定原理

測定に使用したキットは, IMMU test Neopterin (ヘキストジャパン) である. 本キットの原理は, RIA 二抗体法に基き, 検体中のネオプテリンと ¹²⁵I 標識ネオプテリンの, 抗ネオプテリン抗体・第二抗体複合体: anti-neopterin antibody (sheep) pre-precipitated by anti-sheep IgG antibody (donkey) に対する競合反応を利用して測定するものである. 測定法は, 被検血清 20 μ l に ¹²⁵I 標識ネオプテリンおよび抗ネオプテリン抗体・第二抗体複合体を各 100 μ l 加え, 遮光し, 室温にて 1 時間インキュベートした後, 洗浄液 (0.5% Triton X100 水溶液) 1 ml を加え, 直ちに遠心分離し, 上清を吸引除去して沈渣の放射能を測定する.

2. 方法および対象

測定キットの基礎的検討としては, 反応条件の検討 (反応時間, 反応温度, 反応中の光の影響), 最少検出感度, 再現性, 添加回収率, 希釈直線性,

Key words: Neopterin, Radioimmunoassay, Monocyte, Systemic lupus erythematosus, Virus-associated hemophagocytic syndrome.

被検血清の安定性、および溶血の影響について検討した。

年齢別正常値については、埼玉県立小児医療センター感染免疫科外来受診児のうち急性および慢性疾患を否定した1歳以下14例、1～5歳10例、6～10歳13例、11～15歳7例、16～20歳11例、の計55例および成人例として同センター職員ボランティア31例にて求めた。

臨床的検討では、全身性エリテマトーデス(SLE)7例、若年性関節リウマチ(JRA)12例、ウイルス感染症として麻疹、水痘、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染、ムンプス、急性上気道炎などを含む13例、気管支喘息(Bronchial Asthma, BA)6例、細菌感染症として細菌性髄膜炎、気管支肺炎、急性腺窩性扁桃炎、敗血症、などを含む19例、亜急性壊死性リンパ節炎(SNL)3例、伝染性単核球症(IM)4例、virus-associated-hemophagocytic syndrome (VAHS) 3例、およびgraft-versus-host disease (GVHD) 1例について血清ネオプテリン濃度を測定し比較した。さらに細菌感染症4例(細菌性肺炎3、細菌性腸炎1例)について、急性期(入院時)と回復期(軽快退院時)を測定し比較した。以上の患者において血清BUN、血清クレアチニン値の検討で腎機能障害を認めた者はいなかった。有意性の検定にはStudent's 両側 t 検定を使用した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 最少検出感度

希釈法にて、7重測定し有意差検定(危険率1%)を行ったところ、最少検出感度は0.2 ng/mlであった。

2) 反応条件の検討

反応条件の検討として、反応時間については、30分、60分、120分、反応温度については、4°C、20°C、37°C、反応中の光の影響については蛍光灯により、遮光、500ルクス(室内相当)、10,000ルクスにて行った。またそれぞれ同時に、高、中、低濃度のプール血清を測定した。反応温度が上がるにつれ標準曲線の傾きは緩くなる傾向を示したが、時間および光の検討に対しては B_0/T でプロットした標準曲線は、変化を示さなかった(Fig. 1a, 1b, 1c)。同時に測定した高、中、低濃度のプール血清測定値は、どの条件の検討においてもアッセイ間変動程度で規則的な変動傾向もなく反応条件による影響は見られなかった(Table 1)。

3) 再現性

高、中、低濃度のプール血清にて行ったところ、測定内変動($n=10$)はそれぞれ、C.V.=6.1, 3.4, 3.9%で、測定間変動($n=10$, 3ロット間)はそれぞれ C.V.=14.3, 6.7, 6.0% とほぼ良好な結果で

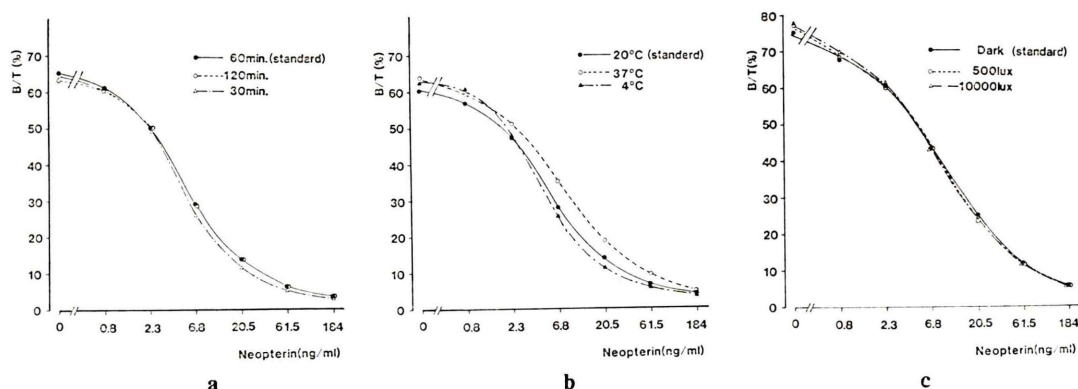


Fig. 1 The effect of various parameters on neopterin assay.

(a): incubation time, (b): temperature, (c): light exposure (fluorecent lamp)

Table 1 The effect of incubation time, temperature, or light exposure (fluorescent lamp) on pooled sera

Test conditions	Neopterin (ng/ml)								
	Time			Temperature			Light (fluorescent lamp)		
	30 min	60 min	120 min	4°C	20°C	37°C	0 lux	500 lux	10,000 lux
low reference serum	1.4	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.0	1.1	1.4
med. reference serum	10.3	10.8	10.0	10.5	9.8	10.1	11.6	11.8	11.6
high reference serum	31.2	35.6	33.0	32.5	33.4	33.7	37.3	35.9	36.8

Table 2 Reproducibility; intra-assay variation (n=10) and inter-assay variation (n=10) of pooled sera

Intra-assay variation (n=10)			
Serum	Mean (ng/ml)	S.D.	C.V. (%)
A	1.60	0.10	6.3
B	9.65	0.33	3.4
C	26.18	1.03	3.9
Inter-assay variation (n=10)			
Serum	Mean (ng/ml)	S.D.	C.V. (%)
D	1.35	0.19	14.1
E	10.78	0.73	6.8
F	35.94	2.15	6.0

あった (Table 2).

4) 添加回収率

患児血清 2 検体にキット添付の標準液 4 濃度を 1:1 の割合で添加したときの平均回収率は検体 1 で 107.0%, 検体 2 では 106.2% であった (Table 3).

5) 希釈直線性

VAHS 2 例, GVHD 1 例の高濃度患児血清 3 検体をキット添付の緩衝液にて 32 倍まで倍々希釈し測定したところ, 原点を通る良好な直線性が見られた (Fig. 2).

6) 被検血清の安定性, および溶血の影響

被検血清に凍結融解を 6 回まで行ったところ, 凍結前 1.07 ng/ml から 1.00 ng/ml, 2.69 ng/ml から 2.66 ng/ml, 10.09 ng/ml から 10.43 ng/ml, と変化は認められなかった. 検体の光による影響は, 室内光 (500 ルクス) にて 24 時間まで放置したところ, 4 時間以降で低値傾向となり 24 時間後では約 10% の低下が認められた (Table 4). 溶血の影響については, 1.01 ng/ml の検体は 10% 溶血で 1.13

Table 3 Recovery test; kit standards were added to sera at the ratio of 1:1 (vol: vol)

Serum 1				
Add (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovered (ng/ml)	Recovery (%)	Mean recovery (%)
0.00	2.74	—	—	
3.40	6.48	3.74	110.0	
10.25	13.49	10.75	104.9	107.0
30.75	35.69	32.95	107.2	
92.00	100.28	97.54	106.0	
Serum 2				
Add (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovered (ng/ml)	Recovery (%)	Mean recovery (%)
0.00	7.09	—	—	
3.40	10.69	3.60	105.9	
10.25	18.18	11.09	108.2	106.2
30.75	39.79	32.70	106.3	
92.0	103.09	96.00	104.3	

ng/ml, 1.10 ng/ml および 1.23 ng/ml の検体は 5% 溶血でそれぞれ 1.20 ng/ml, 1.22 ng/ml と変化は認められなかった.

2. 臨床的検討

1) 年齢別正常値

加齢により正常値に変動を認めた. 1 歳未満で 2.29 ± 0.97 ng/ml (n=14), 1~5 歳で 1.91 ± 0.69 ng/ml (n=10), 6~10 歳で 1.05 ± 0.35 ng/ml (n=13), 11~15 歳で 1.48 ± 0.60 ng/ml (n=7), 16~20 歳で 1.41 ± 0.55 ng/ml (n=11), 成人 1.24 ± 0.35 ng/ml (n=31) と, 1 歳未満が高値を示し, 以降成人に近づくにしたがい低下傾向が見られた. 1 歳未満では 6~10 歳 ($p < 0.01$), 成人 ($p < 0.01$) と較べて有意に上昇していた. 以上計 86 例での平均値 ± 2 S.D. は 1.50 ± 1.40 ng/ml であった (Fig. 3).

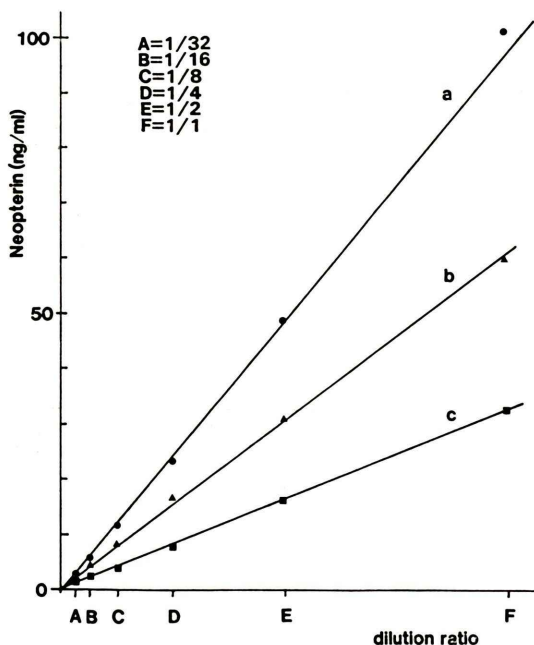


Fig. 2 Dilution test; three patients' sera were assessed.

Table 4 The effect of light exposure (fluorecent lamp) to stored sera on neopterin assay

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	8 hr	24 hr
Serum A (ng/ml)	0.97	0.95	0.97	0.96	0.88	0.84
Serum B (ng/ml)	2.65	2.61	2.58	2.44	2.55	2.38
Serum C (ng/ml)	10.26	10.20	10.34	9.66	9.99	9.45

2) 疾患別血清ネオプテリン濃度

VAHS では $17.8-59.0$ ng/ml ($n=3$), GVHD では 101.1 ng/ml ($n=1$) と非常に高い値を示したほか, SNL で 8.77 ± 0.85 ng/ml ($n=3$), 細菌感染症で 3.89 ± 2.19 ng/ml ($n=19$), SLE で 2.93 ± 2.60 ng/ml ($n=7$) と, 正常値と比較して著明な高値を示し, またウィルス感染症で 2.05 ± 1.11 ng/ml ($n=13$), IM で 2.38 ± 1.94 ng/ml ($n=4$) と正常値上限を越える高値傾向が認められた。しかし, JRA では 1.82 ± 0.96 ng/ml ($n=12$), 気管支喘息では 1.10 ± 0.42 ng/ml ($n=6$) と, 正常値とほとんど差はなかった。このうち SLE では高値 3 例が

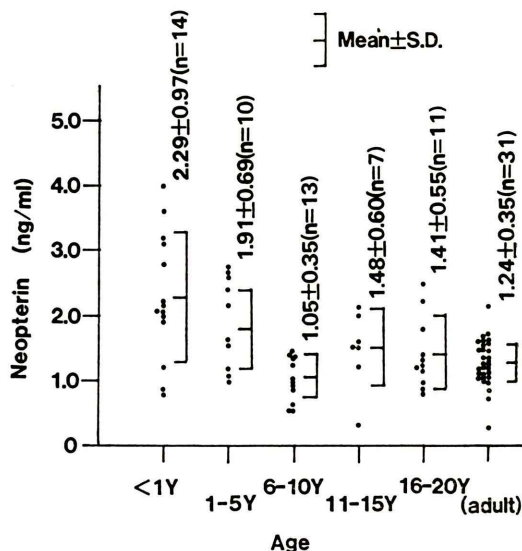


Fig. 3 Normal neopterin concentration in serum of different age-groups ($n=86$).

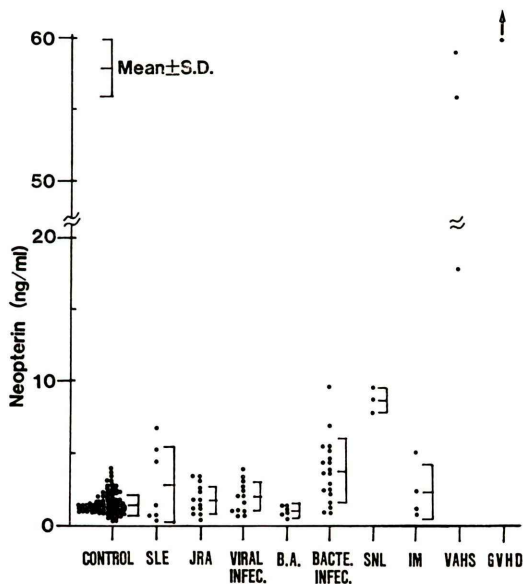


Fig. 4 Serum neopterin levels in various diseases. CONTROL: normal controls, SLE: systemic lupus erythematosus, JRA: juvenil rheumatoid arthritis, VIRAL INFECTION: viral infection, B.A.: bronchial asthma, BACTE. INFECTION: bacterial infection, SNL: subacute necrotizing lymphadenitis, IM: infectious mononucleosis, VAHS: virus-associated hemophagocytic syndrome, GVHD: graft-versus-host disease.

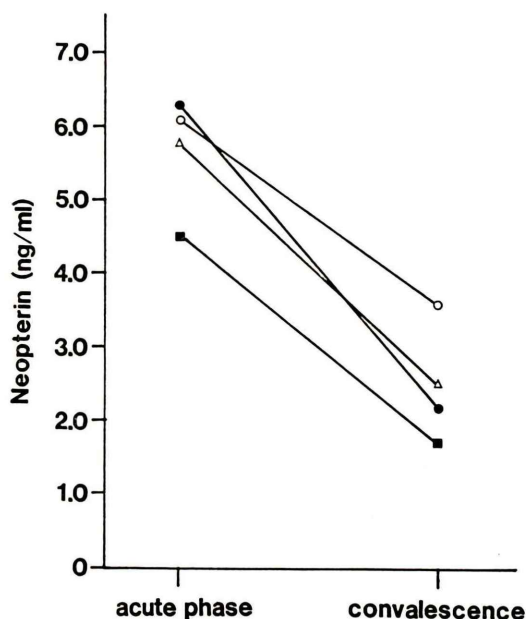


Fig. 5 Serum neopterin levels of acute phase and that of convalescence in 4 patients with bacterial infections.

活動性（ステロイド治療中であるが CNS ループス, colonic necrosis, 関節炎を併発した患児）で 5.60 ± 1.11 ng/ml ($n=3$), 低値 4 例が非活動性（ステロイド療法により急性期症状の寛解状態にある患児）で 0.93 ± 0.42 ng/ml ($n=4$) と, 明らかに活動性が高い値を示していた (Fig. 4).

3) 細菌感染症における病態との比較

細菌感染症例 4 例（細菌性肺炎 3 例, 細菌性腸炎 1 例）における病態と血清ネオプテリン濃度の比較では, 急性期（入院時） 5.66 ± 0.81 ng/ml に対して, 回復期（軽快退院時） 2.50 ± 0.80 ng/ml と低下し, 病態と一致した変動が認められた (Fig. 5).

IV. 考 察

血液中のネオプテリンは, 腎臓より尿中へ排泄されるため腎機能の影響を受け, 今回の検討においては除外したが腎不全において高値を示す⁹⁾. また尿中に較べて血清ネオプテリン濃度は低レベル¹²⁾であるため, クロマトグラフィなどの従来

法では測定が困難であったが, RIA 法により高精度に大量検体の測定が可能となった⁷⁾. ネオプテリンは体内では, 単球-マクロファージ系細胞内において GTPシクロヒドロラーゼにより, GTP よりジヒドロネオプテリンとして産生¹⁾され, 一部は一定の割合で酸化によりネオプテリンとなっている. 本キットでは酸化型ネオプテリンである D-erythro-ネオプテリンを測定している.

従来の RIA 法キット¹¹⁾に較べ今回著者らの使用したキットは, 基礎的検討結果において 1 ステップ法 (1 時間) にて行う簡便な操作法で必要検体量も $20 \mu\text{l}$ と少なく, 基礎的検討においても良好な結果が得られた. 希釈法で求めた最少検出感度は 0.2 ng/ml と必要十分で, 測定レンジも標準液濃度で $0.8-184$ ng/ml と広く, 血清では希釈の必要な検体はなかった. ただ, 反応沈殿物は柔らかなため, 上清をアスピレートする際には注意が必要であった. 反応条件の検討においては, 条件の変動による標準曲線の変動は少なく, また同時測定した検体との解離も見られない安定した反応系であった. ネオプテリンは光に鋭敏であるとされるが, 反応中の光の影響については蛍光灯下では変化なく, 通常の検査室内の測定中においては遮光の必要性は少ないものと思われた. 検体の保存性では凍結融解および溶血の影響は見られず, 光によって 24 時間後に 10% の低下を示し, 保存中の遮光は必要である. 以上のように本測定法は, 安定性, 操作性にすぐれ多量の検体を測定する日常検査としても, 十分満足出来るものであった.

臨床的検討に先駆けて行った加齢による正常値の検討では, 1 歳未満で 2.29 ± 0.97 ng/ml ($n=14$) と高値が認められ, 1~5 歳で 1.91 ± 0.69 ng/ml ($n=10$) とやや高く, それ以降は成人正常値 1.24 ± 0.35 ng/ml ($n=31$) に近い値となった. 年齢別正常値において, 1 歳未満が有意に高いのはこの時期における数々の感染や単球機能の活性化を示しているものと思われるが, インビトロでの単球-マクロファージ系の検索を含めて今後の検討が必要である.

疾患別の評価としては, VAHS 3 例において

17.8–59.0 ng/ml と他の疾患と比較しても著明な高値が認められた。これはウィルス感染により活性化されたリンパ球を介する単球-マクロファージ系の著しい活性化のためと思われた。また 1 例ではあるが GVHD で 100 ng/ml を越える著明な高値が認められた。そのほか SNL で 8.77 ± 0.85 ng/ml (n=3), 細菌感染症で 3.89 ± 2.19 ng/ml (n=19), SLE で 2.93 ± 2.60 ng/ml (n=7) と、正常値と比較して著明な高値を示したのをはじめ、ウィルス感染症でも 2.05 ± 1.11 ng/ml (n=13), IM で 2.38 ± 1.94 ng/ml (n=4) と正常値上限を越える高値傾向が認められた。しかし、JRA では 1.82 ± 0.96 ng/ml (n=12), 気管支喘息では 1.10 ± 0.42 ng/ml (n=6) と、正常値とほとんど差はなかった。またウィルス感染症と細菌感染症を比較してみると、ウィルス感染症の値が 2.05 ± 1.11 ng/ml とさほど上昇しないのに対して細菌感染症では 3.89 ± 2.19 ng/ml と大きく上昇した。このことは、ウィルス感染だけでなく、細菌感染症においても直接あるいはインターロイキンを介して、単球-マクロファージ系が活性化されていることを示していると考えられた。SLE では活動性 5.60 ± 1.11 ng/ml (n=3) に対して、非活動性では 0.93 ± 0.42 ng/ml (n=4) と、明らかに活動性のほうが高い値を示していた。これは JRA においては活動期あるいは非活動期をとうして一貫してネオプテリンの上昇を見なかったことと較べて、SLE においては活動期の細胞性免疫能と単球-マクロファージ系の機能がより特徴的に亢進していることが示唆された。

細菌感染症における病態と血清ネオプテリン値の比較 4 例では、急性期の高値 (5.66 ± 0.81 ng/ml) に対して、回復期に低値傾向 (2.49 ± 0.79 ng/ml) になる病態と一致した変動を示し、血清ネオプテリンの測定が病態のモニターの一助に成り得ることを示唆していた。

ネオプテリンは、すでにインビトロの実験において活性化された T 細胞由来である γ -IFN の刺激によって単球-マクロファージ系より産生されることが明らかになっていたが³⁾、著者らの実験

によればネオプテリンは血管内皮細胞から γ -IFN さらに γ -IFN に較べて弱いながら α -IFN の刺激によっても産生されることが確認された¹³⁾。このことにより血清ネオプテリン濃度は他の細胞からの放出、そして T 細胞以外の活性化をも反映している可能性がある。しかし血清ネオプテリン値は、感染症や免疫疾患などで上昇するし、病態ともよく一致することより臨床的有用性は高いものと考えられる。また今回著者らの検討したウィルス感染症では C-reactive protein (CRP) は低値でありネオプテリンの上昇との相関は見られなかったが、血清ネオプテリン値は病勢と一致した変動を示し、このことから病勢のマーカーとして CRP とは異なる有用性を持つのではないかと考えられた。しかしながら細菌感染症、免疫疾患等において血清ネオプテリン値が CRP あるいは赤沈などと相関を有するか否かは今後の解析が必要と思われる。臨床的にも単球-マクロファージ系の著明な機能亢進が示されている VAHS や GVHD において血清ネオプテリン濃度は著明な高値を示すことから、骨髓穿刺による検索あるいは皮膚の生検を補完する検査法と成りうる可能性があると考えられた。

V. まとめ

RIA による血清ネオプテリンの測定は、基礎的検討において良好な特性を示し、簡便で安定した測定系であることよりルチン検査として十分満足のゆけるものであった。血清ネオプテリンの年齢別正常値は乳時期において成人の 2 倍程度高いことが明らかになり、それ以降は成人の値に近づく傾向を示した。疾患別では VAHS で特に著明な高値を示すことが明らかになったほか、SNL や細菌感染症また SLE で高く、ウィルス感染症や IM でやや高い値を示した。中でも SLE と細菌感染症では病態によく一致した変動を示すことも明らかになった。

ゆえに血清ネオプテリン濃度は感染症や免疫系疾患において、その血清中濃度の上昇程度が疾患により異なることや病態に一致した変動を示すこ

となどから、診断への補助的検査や病勢の観察に、特に有用と思われた。また細胞性免疫の示標として、CRP など他の検査法を補完する検査法としても有用性は高いと思われた。

文 献

- 1) Ziegler I: Production of Pteridines by T Cells and Macrophages: Modulator Function in Interleukin 2 Signal Transmission. *Lymphokines*. **14**: 177-201
- 2) Niederwieser A, Curtius H-Ch, Bettoni O, et al: ATYPICAL PHENYLKETONURIA CAUSED BY 7,8-DIHYDROBIOPTERIN SYNTHETASE DEFICIENCY. *Lancet* **i**: 131-133, 1979
- 3) Huber Ch, Batchelor JR, Fuchs D, et al: IMMUNE RESPONSE-ASSOCIATED PRODUCTION OF NEOPTERIN: Release from Macrophages Primarily under Control of Interferon-Gamma. *J Exp Med* **160**: 310-316, 1984
- 4) Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al: Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunology Today* **9**: 150-155, 1988
- 5) Wachter H, Hausen A, Grassmayr K: Erhöhte Ausscheidung von Neopterin im Harn von Patienten mit malignen Tumoren und mit Viruserkrankungen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **360**: 1957-1960, 1979
- 6) Fuchs D, Hausen A, Knosp O, et al: NEOPTERIN EVALUATION IN PATIENTS SUFFERING FROM PULMONARY TUBERCULOSIS. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. **2**: 281-291, 1983
- 7) Rokos K, Rokos H: PTERIDINES AS TUMOR MARKERS? ATTEMPT OF EVALUATION BY HPLC AND A RADIOIMMUNOASSAY FOR NEOPTERIN. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. **1**: 117-130, 1982
- 8) Hausen A, Fuchs D, Reibnegger G, et al: NEOPTERIN AS INDEX FOR ACTIVITY OF DISEASE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. **2**: 245-254, 1983
- 9) Schäfer AJ, Daniel V, Dreikorn K, et al: ASSESSMENT OF PLASMA NEOPTERIN IN CLINICAL KIDNEY TRANSPLANTATION. *Transplantation*. **41**: 454-459, 1986
- 10) Hausen A, Fuchs D, König K, et al: DETERMINATION OF NEOPTERIN IN HUMAN URINE BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *J Chromatography* **227**: 61-70, 1982
- 11) Rokos H, Rokos K: RADIOIMMUNOASSAY FOR NEOPTERIN IN SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH VIRAL INFECTIONS, LYMPHADENOPATHY SYNDROME, AIDS, LEPROSY AND IN NORMALS AFTER HEPATITIS VACCINATION. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. **3**: 503-513, 1984
- 12) Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G, et al: Determination of Neopterin in Serum and Urine. *Clinical Chemistry* **33**: 62-66, 1987
- 13) 関 孝, 大石 勉, 久保政勝, 他: ヒト血管内皮細胞からのネオプテリン分泌. *医学のあゆみ* **152**: 251-252, 1990