

GODを用いた17-OHP測定法の マススクリーニングへの応用

成瀬浩¹⁾, 鈴木恵美子²⁾, 熊田淳子¹⁾, 市原侃³⁾, 木崎節子³⁾, 塚田和弘⁴⁾

1) 国立武蔵療養所神経センター 2) 日本公衆衛生協会 3) 北海道立衛生研究所 4) 三共株式会社

〔研究目的〕

先天性副腎過形成症(CAHと略)のスクリーニングを全国的に実施するためには、どこの施設でも行なえ、しかも高感度で、操作も簡単なスクリーニング方法が必要である。そこで我々は、昨年より、glucose oxydase(GODと略)を用いる17- α -hydroxy-progesterone(17-OHPと略)測定のエIAの開発改良を行なって来た。今年度は、このGODを用いた17-OHP測定試薬の量産を行い、現実のスクリーニングに応用した折の妥当性、試薬のロット差の程度などを検討した。

〔研究方法〕

精製第2抗体を試験管に塗布する固相法を採用し、GODと17-OHPのconjugateを用いた。酵素活性の測定は、glucoseを基質とし、生成するH₂O₂をHRP-4-hydroxy-phenyl acetic acid系による蛍光測定を行なった。

検体としては、北海道立衛生研究所に送られて来た、一般の新生児スクリーニング用の血液濾紙で、代謝異常検査およびクレチン症検査の終了したものをを用いた。

GODと17-OHPとのconjugateは、辻らの方法により作製し、17-OHP抗体は三共製薬製造のものを用いた。第二抗体は、アフィニティクロマトにより精製したものをを用いた。

操作法としては、第2抗体塗布の試験管に3mmディスク1枚を入れ、緩衝液300 μ l, conjugateおよび第1抗体を各100 μ l加える。攪拌後、4 $^{\circ}$ cで1夜インキュベートし、洗浄する。その後、HRP試薬500 μ l, 基質液100 μ lを加え、37 $^{\circ}$ cで2時間インキュベートする。反応停止液500 μ lを加えた後、蛍光測定を行なう(Ex=313nm, Em=405nm)。スタンダードとしては、17-OHPを含む基準血液濾紙を作製して用いた。

〔結果と考察〕

第1表には、17-OHP測定時の再現性についての結果を示した。17-OHPが50pg/discと100pg/discの血液濾紙検体について、同一ロットでの、アッセイ間のB/Bo値の平均値と変動係数、および、全アッセイでのB/Bo値の平均値と変動係数を示した。今回は、4ロットの試薬を用いて検討したが、50pg/discの検体のロット内変動は、MD 316-4では、CV=6.2%, MD 316-6ではCV=12%, MD 316-7ではCV=8.3%, MD 316-8では

第1表 標準曲線アッセイ間及びロット間変動

| ロット番号 | アッセイ番号 | 50pg/disc B/Bo | 100pg/disc B/Bo |
|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| MD 316-4 | A-1 | 460 | 347 |
| | A-2 | 517 | 407 |
| | A-3 | 538 | 370 |
| | A-4 | 537 | 374 |
| | A-5 | 550 | 414 |
| | A-6 | 518 | 360 |
| | $\bar{x} \pm SD, CV$ | | 520 \pm 32, 6.2% |
| MD 316-6 | 2 | 526 | 419 |
| | 3 | 464 | 377 |
| | 4 | 449 | 334 |
| | 6 | 466 | 330 |
| | 7 | 593 | 505 |
| | $\bar{x} \pm SD, CV$ | | 50.0 \pm 6.0, 12% |
| MD 316-7 | 14 | 464 | 315 |
| | 15 | 432 | 258 |
| | 16 | 403 | 296 |
| | 17 | 375 | 286 |
| | 18 | 389 | 268 |
| | 19 | 386 | 303 |
| | $\bar{x} \pm SD, CV$ | | 40.8 \pm 3.4, 8.3% |
| MD 316-8 | 20 | 494 | 296 |
| | 21 | 496 | 324 |
| | 22 | 493 | 310 |
| | 23 | 485 | 323 |
| | 24 | 520 | 371 |
| | 26 | 509 | 349 |
| | 27 | 399 | 287 |
| | 28 | 446 | 289 |
| | 30 | 416 | 262 |
| | $\bar{x} \pm SD, CV$ | | 47.3 \pm 4.3, 9.1% |
| | | 47.4 \pm 5.7, 12.0% | 33.7 \pm 5.7, 16.9% |

の変動は、50pg/discが12.0%、100pg/discが16.9%という結果であった。各ロットごとで多少の差はあるものの、スクリーニングでの再現性としては、ほぼ良いものと考えられる。

表2には、実際のスクリーニングの結果を示した。アッセイは26回行ない、その時使用したのは前述の4ロットである。4,345人の一般新生児について、直接法でスクリーニングを行なった。MD 316-6, 7については、直接法で検査した後、上位3%あるいは平均値の2.5倍以上を示した検体について、抽出法による再検査を行なった。MD 316-8では、50pg/disc以上について、抽出法による再検査を行なった。ここで、MD 316-6, 7と、MD 316-8とで、抽出法による再検査を行なうための基準をかえた理由は、MD 316-8を使用した時の一般新生児の17-OHP値分布が他と異なるためである。このロットの試薬では、他のロットよりも分布が広がった。これは、ロット差によるものか、実際に新生児の分布に変動があったのかは、不明であるが、諸般の事情から、このロットの性格によるものではないかと推測している。この点は今後の改良が必要であるが、しかしこの範囲の変動であれば、十分に現実のスクリーニングに応用可能と考えている。

第1図には、血液濾紙ディスク1枚を用いて測定した、一般新生児の17-OHP値分布を示

CV=9.1%であった。
100pg/discのロット内変動は、CV=6.6%、18.3%、7.5%、10.8%であった。MD 316-6のロット内変動が、他のロットと比べやや大きいようであるが、この時には、分注器具の変更や、技術者の交替があったためはっきり試薬のロット差とは言えない。またMD 316-6を用いて得た一般新生児の17-OHP値の分布は、MD 316-4, -7と同様であった。

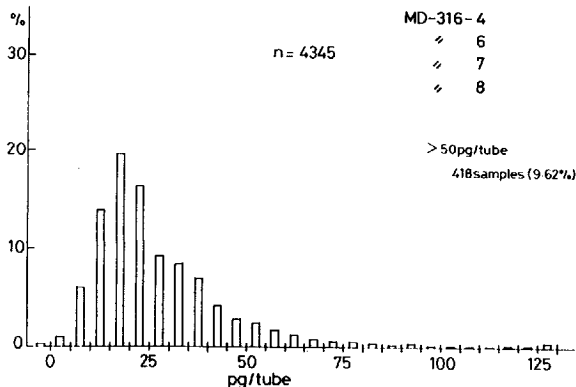
4ロットを用いて行なった合計26のアッセ

した。検査総数は、4,345名であり、そのうち50pg以上を示したのは、418名(9.62%)であった。この値は、既報のデータにほぼ近いものであった。

以上のように、今回行なった検討では、多少のロット差と思われるばらつきがあったものの、この試薬は現実のマスクリーニングへの応用は可能と考えられた。

第2表 先天性副腎皮質過形成症マス・スクリーニング成績

| ロット番号 | アッセイ番号 | 直接法検査数 | 抽出法検査数 | 再採血数 |
|---------|--------|--------|--------|------------|
| MD316-4 | A-1 | 168 | | |
| | A-2 | 168 | | |
| | A-3 | 168 | | |
| | A-4 | 168 | | |
| | A-5 | 168 | | |
| | A-6 | 168 | | |
| MD316-6 | 2 | 192 | 6 | 0 |
| | 3 | 68 | 3 | 0 |
| | 4 | 168 | 9 | 0 |
| | 6 | 68 | 7 | 1 |
| | 7 | 218 | 11 | 0 |
| MD316-7 | 14 | 218 | 15 | 2 |
| | 15 | 221 | 6 | 1 |
| | 16 | 168 | 7 | 0 |
| | 17 | 168 | 7 | 0 |
| | 18 | 168 | 6 | 1 |
| | 19 | 168 | 6 | 1 |
| MD316-8 | 20 | 168 | 16 | 1 |
| | 21 | 168 | 6 | 0 |
| | 22 | 168 | 25 | 3 |
| | 23 | 168 | 48 | 5 |
| | 24 | 168 | 31 | 1 |
| | 26 | 168 | 22 | 3 |
| | 27 | 168 | 11 | 0 |
| | 28 | 168 | 36 | 4 |
| | 30 | 168 | 19 | 3 |
| | | | 4,345 | 297 (8.9%) |



第1図 一般新生児の17-OHP値分布



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



〔研究目的〕

先天性副腎過形成症(CAH と略)のスクリーニングを全国的に実施するためには、どこの施設でも行なえ、しかも高感度で、操作も簡単なスクリーニング方法が必要である。そこで我々は、昨年より、glucose oxydase(GOD と略)を用いる 17 - - hydroxy - progesterone(17-OHP と略)測定の EIA の開発改良を行なって来た。今年度は、この GOD を用いた 17-OHP 測定試薬の量産を行い、現実のスクリーニングに応用した折の妥当性、試薬のロット差の程度などを検討した。