

17 α -ヒドロキシprogステロンのELISA法

辻 章夫, 前田昌子, 荒川秀俊
(昭和大学・薬学部)

序 論

先天性副腎皮質過形成症 (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH)はコルチコイドの生合成過程でステロイドの21水酸化酵素が欠損していることから血中に17 α -ヒドロキシprogステロン (17-OHP) が蓄積する。若し早期に発見できれば, 治療が可能であり, 新生児に対するマススクリーニングが要望されている。

著者らはペルオキシダーゼ (HRP) を標識酵素とする17-OHPの蛍光酵素免疫アッセイ (EIA)^①を開発し, 札幌衛研の福土らによりスクリーニングへの適用が試みられた。^②

又, グルコースオキシダーゼ (GOD) やグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を標識酵素とした高感度な化学又は生物発光EIAを報告してきた。^{③④} マスクリーニングにおいては多数検体を処理するためより簡便な方法が望ましい。著者らはHRPを標識酵素とした17-OHPのELISA法を開発し, 前年度の本研究会議その他で報告した。^⑤ 今回は更に若干の検討を加え, プレリミナリーなスクリーニングの結果と, 各種の抗17-OHP抗体での交差反応性及び抗17-OHPモノクローナル抗体の調製も検討したので併せて報告する。

方 法

ELISAによる17-OHPのアッセイ法をChart 1に示した。又, 各種抗17-OHP抗体の交差反応性はビーズ法によるEIAにより検討した。

結 果

本ELISA法では4-Carboxyethyl thio-17-OHP-BSAを免疫原として得た抗血清及び酵素標識抗原は4-Carboxymethyl thio-17-OHP-HRPを用いた。本法による標準曲線の検量域は直接法, 抽出法共に1.25~250 $\mu\text{g}/\ell$ bloodで, その精度は3.7~10.5 ($n=6$)であった。

Fig 1に本法による17-OHPのプレリミナリーなスクリーニングのヒストグラムを示した。

735検体について測定し, 30 $\mu\text{g}/\ell$ 以上の検体35について抽出法で検討したところ, 何れも30 pg/disc 以下となりCAHの患者は検出されなかった。Fig 2にはビーズ法 (蛍光法) とELISA法との相関を示した。 ($r=0.910$)

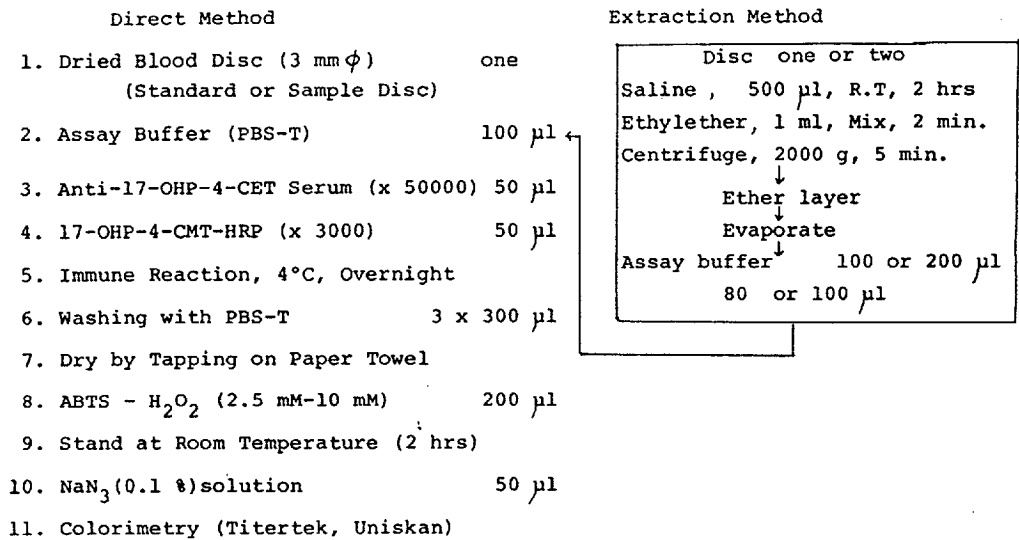
Table 1に各種の抗17-OHP抗体の交差反応性を示した。Tableからわかるように未熟児の血中に多く存在するといわれている水溶性ステロイドに対する交差反応性は本ELISAで用い

ている抗体とHRP標識体との組合せではかなり小さいように見受けられる。又、17-OHPのモノクローナル抗体についてはTable 2に示すように7種のクローンが得られたが、そのうち少なくとも2種は比較的関連ステロイドに対する交差反応性も小さくマスキリングに適用可能と思われ、現在アツセイ系について検討中である。

文 献

- ① H. Arakawa, M. Maeda and A. Tsuji ; Chem, Pharm, Bull. 30, 3036 (1982)
- ② 福士 勝, 林 英夫, 高杉信男, 松浦信夫, 荒川秀俊, 前田昌子, 辻 章夫 ; 代謝異常スクリーニング研究会々報 7, 66 (1982)
- ③ H. Arakawa, M. Maeda and A. Tsuji ; Immunoenzymatic Techniques. P. 23 (1983)
- ④ 藪内正彦, 前田昌子, 辻 章夫 ; 分析化学, 34, 6 (1985)
- ⑤ 前田昌子, 池上卓夫, 荒川秀俊, 辻 章夫他 ; 第7回生体成分の分析化学シンポジウム要旨集 P. 51 (1985), 代謝異常スクリーニング研究会々報 9, (1985)

Chart 1
ELISA Procedure for 17 α -Hydroxyprogesterone (17-OHP)



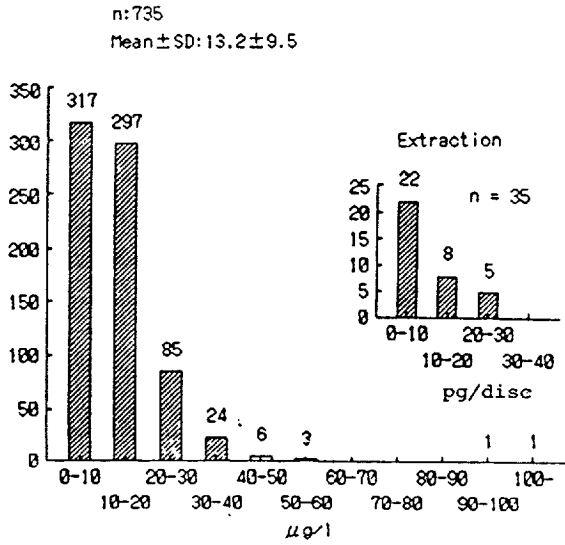


Fig.1 Histograms of 17-OHP Preliminary Screening

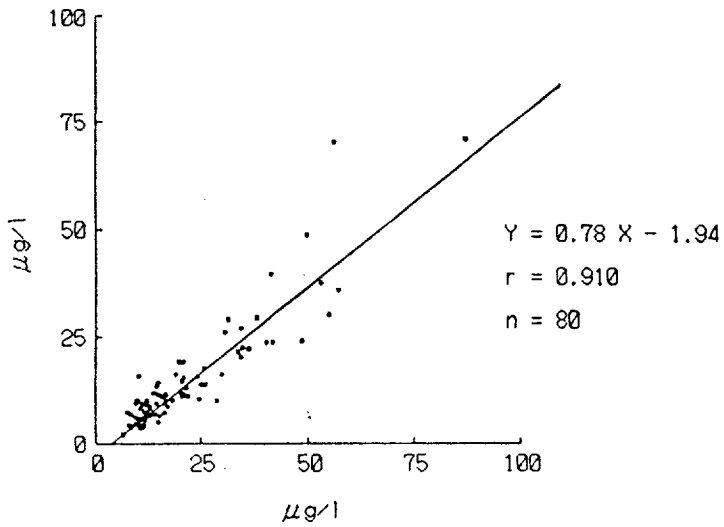


Fig.2 Correlation between ELISA (Y) and EIA (X)
using Dried Blood Spots

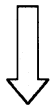
Table 1 Specificities of Various Antibodies against 17-OHP

steroid	antibody conjugate		3-CMO(15)	4-CET(10)	4-CET(10)	11-HS(1)	7-Miles
	3-CMO(3)	4-CMT(3)	3-CMO(3)	3-CMO(3)	3-CMO(3)	3-CMO(3)	
17-OH-Progesterone	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
17-OH-Pregnenolone	4.3	0.5	7.2	2.1	1.1		
Progesterone	4.8	1.1	3.2	3.9	11.9		
Pregnenolone	0.7	0.1	0.3	<0.1	0.1		
16-OH-Progesterone	0.1	0.1	0.8	3.2	1.8		
16-OH-Pregnenolone	-	0.01	0.2	0.1	0.1		
Cortisol	0.02	<0.01	0.3	1.3	0.7		
21-Deoxycortisol	2.5	<0.01	4.6	14.6	25.8		
17-OH-PN-3-sulfate	10.0	5.5	49.6	52.1	19.7		
Others	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
Affinity Constant ($\times 10^9$)	5.4	6.0	6.0	0.73	4.5		

() ; Dilution , $\times 10^4$

Table 2 Specificities of Various Antibody Clones against 17-OHP

steroid	antibdy clone						
	57G6.1	138H8.1	4B2.2.1	4B2.2.3	7D7.2.3	9F8.9.1	101B11.1
17-OH-Progesterone	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
17-OH-Pregnenolone	9.6	13.0	1.6	2.2	7.8	4.4	3.8
Progesterone	15.3	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
Pregnenolone	2.3	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.9
16-OH-Progesterone	<0.5	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
16-OH-Pregnenolone	1.0	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
Cortisol	<0.5	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
21-Deoxycortisol	<0.5	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
17-OH-PN-3-sulfate	90.9	85.0	7.5	9.6	184.6	269.6	90.0
Others	<0.5	<1.5	<0.4	<0.7	<1.3	<0.6	<0.8
Affinity Constant ($\times 10^9$)	3.0	1.5	>10	>10	>10	>10	1.8



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



序論

先天性副腎皮質過形成症(Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH)はコルチコイドの生合成過程でステロイドの21水酸化酵素が欠損していることから血中に17- β -ヒドロキシprogesterone(17-OHP)が蓄積する。若し早期に発見できれば、治療が可能であり、新生児に対するマススクリーニングが要望されている。

著者らはペルオキシダーゼ(HRP)を標識酵素とする17-OHPの蛍光酵素免疫アッセイ(EIA)を開発し、札幌衛研の福土らによりスクリーニングへの適用が試みられた。

又、グルコースオキシダーゼ(GOD)やグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を標識酵素とした高感度な化学又は生物発光EIAを報告してきた。マススクリーニングにおいては多数検体を処理するためより簡便な方法が望ましい。著者らはHRPを標識酵素とした17-OHPのELISA法を開発し、前年度の本研究会議その他で報告した。今回は更に若干の検討を加え、プレリミナリーなスクリーニングの結果と、各種の抗17-OHP抗体での交差反応性及び抗17-OHPモノクローナル抗体の調製も検討したので併せて報告する。