

マイクロウェルプレートを用いる EIA 法による 乾燥濾紙血液 17-OHP および Cortisol の測定

高杉信男，福士 勝，荒井 修，水嶋好清（札幌市衛生研究所）

藤枝憲二，松浦信夫（北大医学部小児科）

【研究目的】

17-OHP および Cortisol の迅速，簡便な測定法として，マイクロプレートを用いる EIA の開発と，乾燥濾紙血液を用いる新生児の先天性副腎皮質過形成（CAH）のマス・スクリーニングへの応用について検討を行った。

【研究方法】

(1) 試薬の調製：抗体は 17-OHP-3CMO-BSA，Cortisol-6CMO-BSA より家兎に免疫して作製，17-OHP-3CMO-Peroxidase conjugate，Cortisol-3CMO-Peroxidase conjugate は混合酸無水物法により調製した。第二抗体固相化プレートは抗家兎 IgG 山羊血清 IgG 分画（6 $\mu\text{g Ab/ml PBS}$ ）を 96 穴のマイクロプレートに 0.1 ml 分注し，2 日間コーティング後 PBS で洗浄し，PBS-BSA 0.3 ml でポストコーティングした。基質は *O*-Phenylenediamine， H_2O_2 溶液，停止液は 3N 硫酸とした。

(2) 測定法：各ウェルに 3mm ディスク 1 枚と抗血清 0.1 ml，conjugate 0.05 ml を加え，2 時間から一晩インキュベート後，各ウェルを生理食塩水で洗浄し，基質を 0.15 ml 加え，室温で 30 分反応後，停止液 0.1 ml を加えてマイクロプレートリーダーにより 490 nm で吸光度を測定した。

【研究結果】

(1) 測定感度：3mm ディスク 1 枚で，17-OHP 0.5 ng/ml blood，Cortisol は 10 ng/ml blood まで測定可能であり，測定範囲の precision profile の CV は 20% 以下と良好であった（図 1）。

(2) 再現性：17-OHP の測定内，測定間変動係数は 6.7 ~ 10.5%，Cortisol は 11.5 ~ 16.7% と共に良好な再現性を示した。

(3) ビーズ固相法による蛍光 EIA と本法の相関：ビーズ法と本法の相関を求めたところ，17-OHP は $r=0.961$ ， $y=0.956x-3.66$ ，Cortisol は $r=0.887$ ， $y=0.723x+19.1$ と共に良好であった（図 2）。

(4) 正常新生児の 17-OHP，Cortisol，17-OHP/Cortisol ratio 値：未熟児を含む新生児 1,583 例の 17-OHP 値は $12.5 \pm 7.47 \text{ ng/ml blood}$ （レンジ 1.0 ~ 140 ng/ml blood），Cortisol 値は $89.0 \pm 64.3 \text{ ng/ml blood}$ （レンジ 10 ~ 1,580 ng/ml blood），17-OHP/Cortisol ratio は 0.16 ± 0.08 （レンジ 0.01 ~ 0.86）であった（図 3）。

(5) CAH 患児の 17-OHP, Cortisol, 17-OHP/Cortisol ratio 値: 6 例の CAH 患児のうち, 単純男性化型の 3 例の 17-OHP 値は 109, 315, 465 ng/ml blood, Cortisol 値は 58.9, 35.1, 131.0 ng/ml blood, ratio は 1.85, 8.97, 3.55 であり, 食塩喪失型の 3 例の 17-OHP 値は 1,361, 507, 506 ng/ml blood, Cortisol 値は 111.2, 146.7, 61.3 ng/ml blood, ratio は 12.2, 3.46, 8.25 であった (図 3)。

【結 論】

マイクロプレート固相化法による 17-OHP EIA は, 迅速, 簡便で, 再現性もよく, 17-OHP/Cortisol ratio 値を計算することで正常児と CAH 患児の判別が容易である。また, マス・スクリーニングに用いているビーズ固相法 17-OHP EIA では, 再採血率が 1.0% であったが, マイクロプレートを用いる 17-OHP/Cortisol ratio 値により 0.25% に減少できた。以上の結果から, CAH のマス・スクリーニング法としてマイクロプレート固相 EIA 法による 17-OHP および Cortisol の測定が有効である。

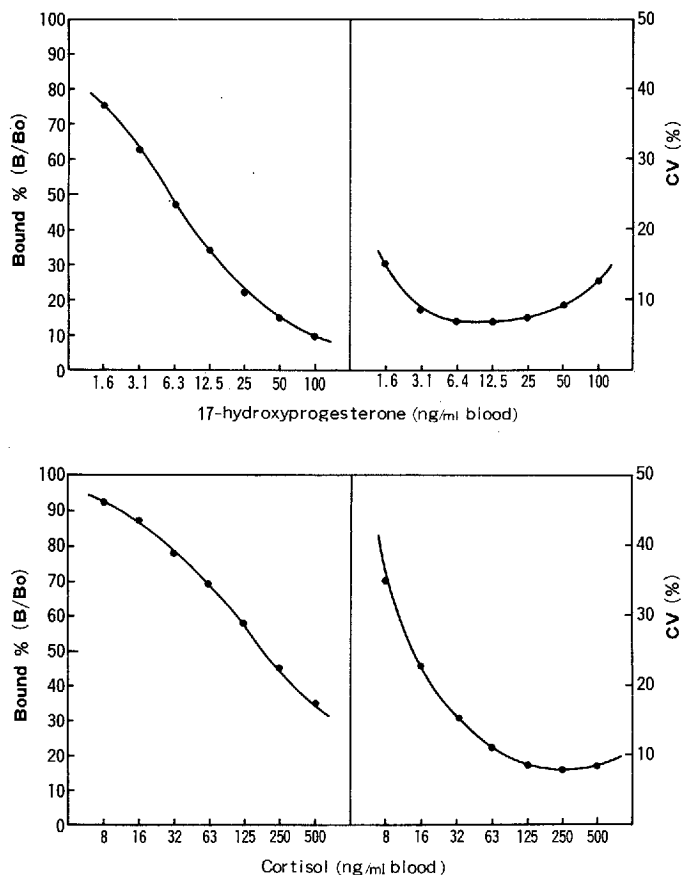


図1 マイクロプレート法の 17-OHP と Cortisol の標準曲線と precision profile

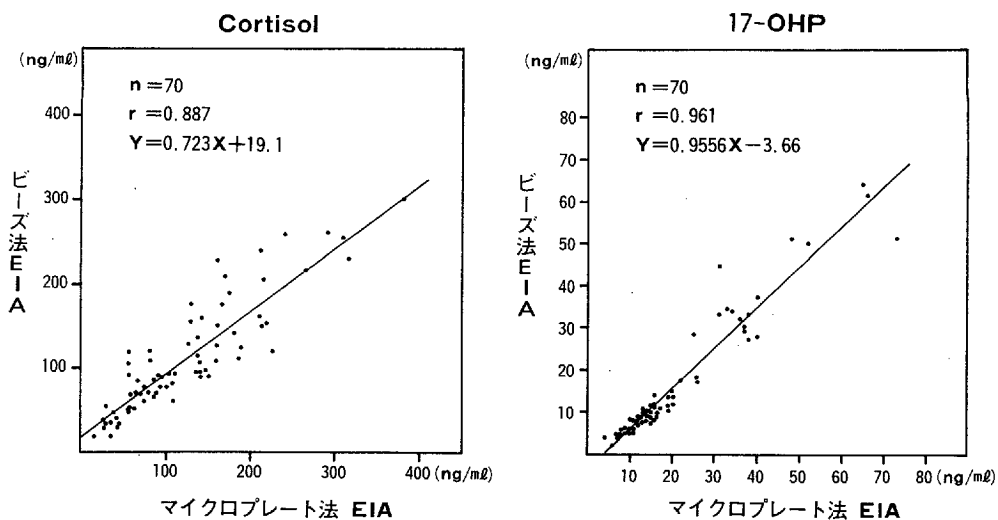
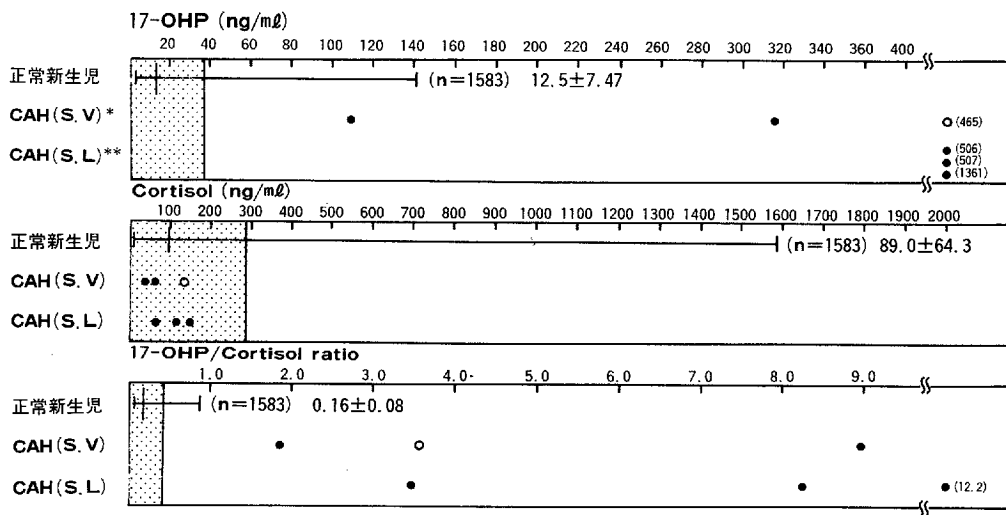
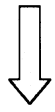


図2 17-OHP, Cortisol EIA でのビーズ固相法とマイクロプレート固相法の相関

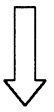


- * 先天性副腎皮質過形成(単純男性化型)
- ** 先天性副腎皮質過形成(食塩喪失型)
- 女児
- 男児

図3 正常新生児(1,583例)と先天性副腎皮質過形成(6例)の17-OHP, Cortisol, 17-OHP/Cortisol ratio 値



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】

17-OHP および Cortisol の迅速,簡便な測定法として,マイクロプレートを用いる EIA の開発と,乾燥濾紙血液を用いる新生児の先天性副腎皮質過形成(CAH)のマス・スクリーニングへの応用について検討を行った。