

乾燥濾紙血液 Testosterone の酵素免疫 測定法の開発

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 (北海道大学医学部小児科)

【研究目的】

乾燥濾紙血液 (DBS) は採血が簡便で、郵送が可能であり、多数検体の測定が容易なことから、先天性甲状腺機能低下症や先天性副腎皮質過形成 (CAH) の新生児マス・スクリーニングで TSH, T_4 , 17-OH progesterone の測定に利用されている。

私達はすでに DBS を用いる 17-OHP や Cortisol の酵素免疫測定法 (EIA) を開発し、CAH のスクリーニングに応用しているが、今回、新たに Testosterone (T) の EIA を開発し、小児期の T の変動と CAH 患児の T 値について検討したので報告する。

【研究方法】

1) 試薬: 抗 T 血清は T-3-Corboxymethyl oxime-bovine serum albumin を家兎に免疫したものを 30 万倍希釈して使用した。酵素標識-T は T-3-CMO と Horseradish peroxidase (HRP) から混合酸無水物法で作製した。B-F 分離は第 2 抗体固相化ボール ($\phi 6\text{mm}$) を用いた。酵素反応基質は 0.01% 過酸化水素-0.01% 3-パラヒドロキシフェニルプロピオン酸系、停止液は 0.15% アジ化ナトリウム含有 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液とした。

2) 測定法: DBS から 3 mm ディスク 2 枚をパンチし、0.05 M リン酸緩衝液 (PBS) で溶出後、ヘキサン: エーテル (3:2) で抽出し、乾固した。抗 T 抗体溶液 0.4 ml, T-HRP 溶液 0.1 ml に第 2 抗体固相化ボールを加えて、25°C で一晩インキュベート後、ボールを洗浄して、基質 0.4 ml を加えて 25°C で 1 時間反応後、停止液 1.0 ml を加えて、励起波長 320 nm, 蛍光波長 405 nm で蛍光強度を測定した。

【研究結果】

- 1) 本法の標準曲線と Precisiunprofile を図 1 に示した。0.1~20 ng/ml まで測定可能であった。
- 2) 各種ステロイドとの交叉反応を表 1 に示した。
- 3) 測定内変動係数は T が 0.4~4.3 ng/ml で 7.0~15.0%, 測定間変動係数は 10.0~21.2% であった (表 2)。
- 4) 本法と血清測定法との相関は、RIA で $r=0.951$, EIA で $r=0.948$ といずれも有意の相関が認められた (図 2)。
- 5) 正常児における年齢による変化を男女別に表 3 に示した。男児で 1~3 カ月で 1.3 ng/ml 前

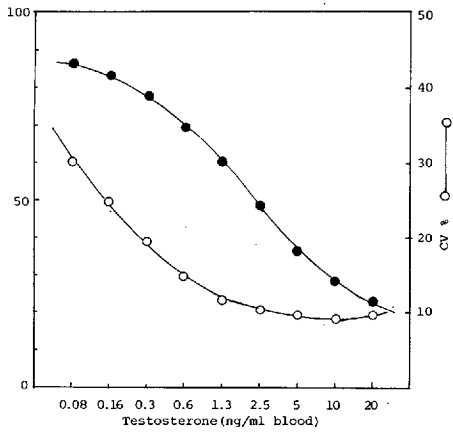


图 1

表 1

Steroids	Cross reactivity (%)
Testosterone	100
5 α -dihydrotestosterone	25.4
5 α -Androstenediol	12.7
4 β -Androstendione	1.5
11 β -Testosterone	2.3
16 α -Testosterone	1.5
Dehydroepiandrosterone	0.1
Dehydroepiandrosterone-3-sulfate	0.1
17-hydroxyprogesterone	<0.1
Progesterone	<0.1
Cortisol	<0.1

表 2

Samples	n	Mean ng/ml	SD	CV, %
Within-assay				
1	8	4.3	0.3	7.0
2	8	2.1	0.3	9.5
3	8	0.4	0.06	15.0
Between-assay				
4	5	4.2	0.42	10.0
5	5	2.4	0.41	17.1
6	5	0.4	0.10	21.2

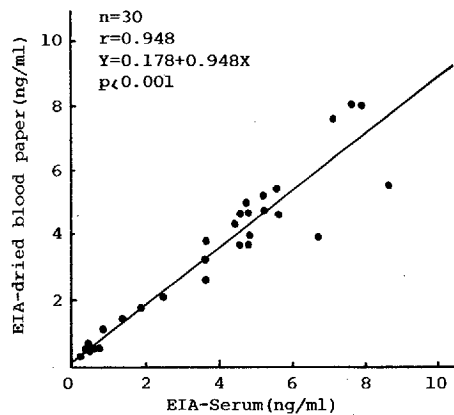
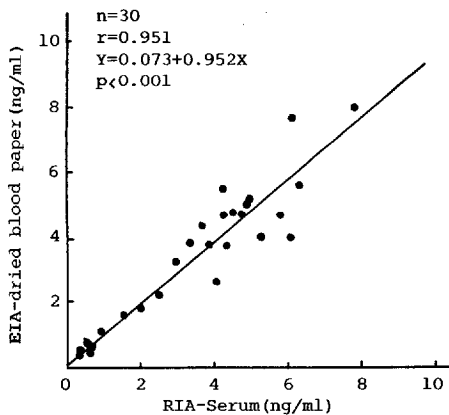


图 2

後とやや高値を示す他は、男女児とも0～10才まで0.1～0.4 ng/ml とほぼ一定値であった。

6) CAHスクリーニングで発見された未治療の塩喪失型 21-hydroxylase 欠損症患児では10 ng/ml 以上の高値を示していた(表4)。

表3

Age	Testosterone (ng/ml)					
	Male			Female		
	Mean	SD	(n)	Mean	SD	(n)
4 - 7 days	0.31	0.18	(30)	0.21	0.18	(30)
1 M	1.29	0.43	(15)	0.25	0.10	(15)
2 - 3 M	1.36	1.00	(6)	0.13	0.12	(6)
4 -10 M	0.34	0.26	(11)	0.14	0.25	(9)
1 Y	0.25	0.73	(14)	0.33	0.63	(4)
2 - 3 Y	0.16	0.16	(7)	0.16	0.22	(12)
4 - 5 Y	0.10	0.11	(7)	0.19	0.20	(9)
6 -10 Y	0.07	0.05	(5)	0.06	0.08	(7)
Adults	7.19	1.25	(5)	0.59	0.20	(4)

表4

Patients	Sex	Age (days)	Testosterone (ng/ml)	17-OHP (ng/ml)
Salt losing				
1	F	3	73.9	234
2	F	2	19.4	82.4
3	F	9	16.3	166
4	F	4	14.5	390
Simple virilizing				
1	M	33	1.27	134.7
2	M	31	1.10	71.8
3	F	18	0.74	135

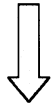
【 考 案 】

今回開発したEIAによるDBSを用いるTの測定は、簡便で再現性、血清値との相関も良好であり、スクリーニング法として十分使用できるものであった。実際に小児期のT値の測定でも、従来の報告と同様に1～3カ月の男児で1.3 ng/ml と一時上昇するが10才までは男児、女児とも0.1～0.4 ng/ml とほぼ一定であること、21-hydroxylase 欠損症児では10 ng/ml 以上であることから、小児期の性腺機能や副腎皮質機能の評価に十分応用可能であり、CAHマス・スクリー

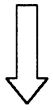
ニングでの二次スクリーニング法としても有用と考えられる。

【 文 献 】

- 1) 福士 勝, 荒井 修, 水嶋好清, 高杉信男, 藤枝憲二, 松浦信夫: 先天性副腎皮質過形成 (21-水酸化酵素欠損症) のマス・スクリーニングに関する研究, 第1報: 乾燥濾紙血液 17α -hydroxyprogesterone の酵素免疫測定法の基礎的検討と新生児マス・スクリーニングへの応用, 日内分泌会誌, 62: 683-696, 1986.
- 2) 福士 勝, 荒井 修, 水嶋好清, 高杉信男, 藤枝憲二, 松浦信夫: 先天性副腎皮質過形成 (21-水酸化酵素欠損症) のマス・スクリーニングに関する研究, 第3報: マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液 17α -hydroxyprogesterone の酵素免疫測定法の開発, 日内分泌会誌, 63: 113-122, 1987.
- 3) 福士 勝, 荒井 修, 水嶋好清, 高杉信男, 藤枝憲二, 松浦信夫: 先天性副腎皮質過形成 (21-水酸化酵素欠損症) のマス・スクリーニングに関する研究, 第4報: マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液 Cortisol の酵素免疫測定法の開発と新生児マス・スクリーニングへの応用, 日内分泌会誌, 63: 印刷中



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】

乾燥濾紙血液(DBS)は採血が簡便で、郵送が可能であり、多数検体の測定が容易なことから、先天性甲状腺機能低下症や先天性副腎皮質過形成(CAH)の新生児マス・スクリーニングでTSH, T4, 17-OHprogesteroneの測定に利用されている。

私達はすでにDBSを用いる17-OHPやCortisolの酵素免疫測定法(EIA)を開発し、CAHのスクリーニングに応用しているが、今回、新たにTestosterone(T)のEIAを開発し、小児期のTの変動とCAH患児のT値について検討したので報告する。