

マス・スクリーニングの精度管理に関する研究

(分担研究：ELISA法による血液濾紙中の 17α -
ヒドロキシprogesterone測定 of 標準化について)

辻 章夫・前田昌子

要約：先天性副腎過形成症（CAH）の新生児マス・スクリーニングに用いられている 17α -ヒドロキシprogesterone（ $17-OHP$ ）の測定用ELISAキットの標準濾紙血液の標準化のための標準血清を作成し、種々の器機的手法を用いて回収率や回収されたものの物性などについて検討した。

見出し語： 17α -ヒドロキシprogesterone、標準血清、標準化

研究目的：血液、尿など複雑なマトリックスである生体試料は、マトリックス効果のため標準品の緩衝溶液などをそのまま標準として用いると問題が多く、正しい測定ができないことが多い。臨床検査の領域ではマトリックス効果を考慮した標準物質を作成することがしばしば試みられている。CAHのマススクリーニングは $17-OHP$ の酵素イムノアッセイ（ELISA）により実施されている。イムノアッセイでは、試料のマトリックス効果に加えて、使用される抗体、酵素標識抗体により測定値が著しく影響される。したがって、各社から市販されている $17-OHP$ 測定キット間の測定値の変動を解消するために $17-OHP$ 含有標準血清を調製することを目的とした。まず、 $17-OHP$ 標準品についての各種物理化学的測定を行い、標準品を

を選定し、次いで血清に添加してモデルの添加血清を調製し、種々の物理化学的方法で検定した。

研究方法：

物理化学的方法としては、以下の手段を用いた。

1. 元素分析
2. マススペクトル法
3. 赤外線吸収スペクトル法
4. 核磁気共鳴スペクトル法
5. 高速液体クロマトグラフ法
6. ELISA法

また、標準品添加血清は $17-OHP$ のアルコール溶液 $50\mu l$ をヒト血清で正確に $5ml$ として調製した。別に比較としてヒト血清の代わりに生理食塩液を用いて正確に希釈した液を調製した。これらにつ

いて上記の手段で検定した。

結果及び考察：

1. 標準17-OHPの選定

17-OHPはSteraloid Inc., Aldorich Chem. Corp., Sigma Chem. Co., Fluka Chem. Co.及び和光純薬(株)製のものについて上記1~6の測定した。いずれの17-OHPも測定の結果には大差はなく、ほぼ同一性を示した。融点の幅の小さいSteraloid Inc.製のものを用いた。各社の17-OHPについての元素分析のデータを以下に示す。

	C(%)	H(%)	融点
Steraloid Inc	76.06	9.15	218~219°
Aldorich Chem.	76.19	9.07	219~220
Sigma Chem, Co	76.43	9.13	—
Fulka Chem. Co	76.20	9.11	215~218
和光純薬(株)	76.06	9.12	218~221
理論値	76.25	9.08	

2. 17-OHP添加血清についての測定

研究方法の項で述べた方法で作成した17-OHP添加血清及び添加生理食塩液について、ジクロロメタンまたはジエチルエーテルで17-OHPを抽出し、種々の物理化学的方法で測定した。マススペクトルに関しては、図1に示すようにイオンピークの330、287、229は標準品と血清または生理食塩液から抽出した17-OHPと同一であった。赤外線吸収スペクトルについても図2に示すように1600~3200 cm⁻¹の間で標準品の吸収スペクトルと良い一致を示した。磁気共鳴スペクトル(NMR)に関しては、若干血清成分の影響で、シグナルが重なった点を考慮すると、標準品とほぼ同一のチャー

トが得られた。元素分析値は

	C(%)	H(%)
標準品：	76.06	9.15
ジクロロメタン抽出(生食)	70.35	9.61
ジクロロメタン抽出(血清)	70.03	10.43
エーテル抽出(生食)	77.85	11.37
エーテル抽出(血清)	77.20	11.74
理論値	76.25	9.08

であった。ジクロロメタン抽出ではCが低めにHがやや高めである。これはエーテル抽出した試料が未精製であるため、一致しなかったものと思われる。

高速液体クロマトグラフ法(HPLC)

での回収試験は、

ジクロロメタン抽出(生食)	: 80~87%	(n=3)
ジクロロメタン抽出(血清)	: 88~94%	(n=3)
エーテル抽出(生食)	: 80~92%	(n=3)
エーテル抽出(血清)	: 79~93%	(n=3)

であり、ほぼ回収されている。

ELISAについては、血清添加標準曲を用いて市販の17-OHP測定キットで測定した。

3. まとめ

今回は、モデル標準血清を作製し、その血清から回収した17-OHPの物性について検討した。1~6の方法での検討の結果は、血清に添加した17-OHPの標準品は化学的变化を受けることなく安定であることがわかった。またこの17-OHP添加血清は冷蔵庫中で約1か月間保存しても安定であった。長期に保存する場合は分注し、凍結保存すればかなりの期間安定と思われる。

Abstract

Standardization for the determination of 17 α -hydroxyprogesterone

Akio Tsuji and Masako Maeda*

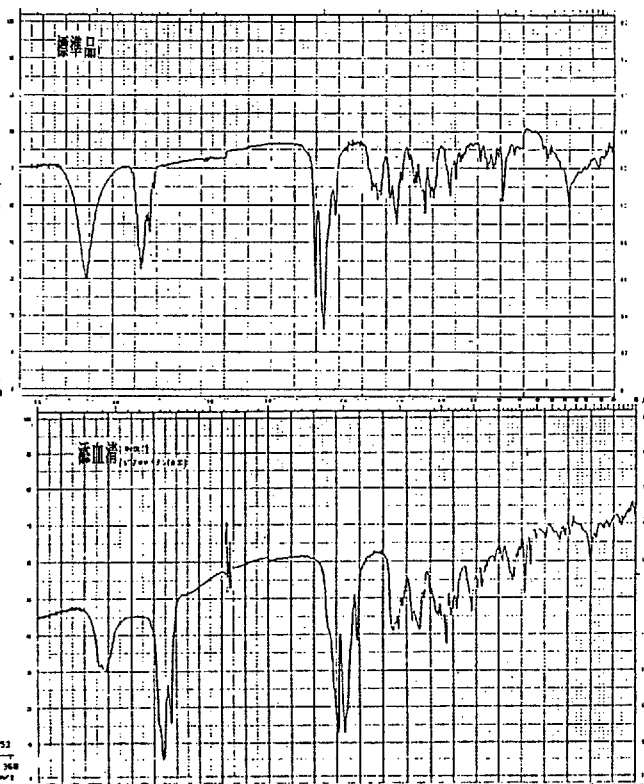
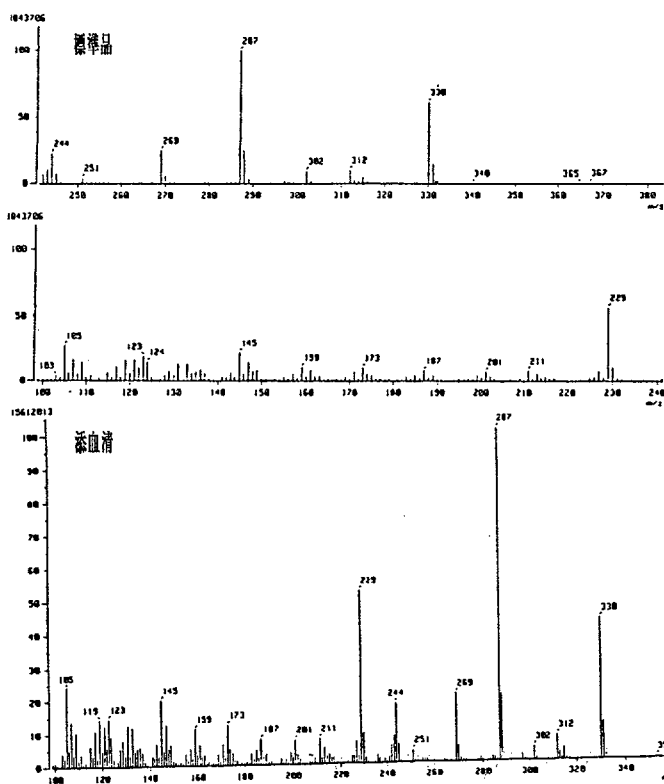
The standardization of ELISA for 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood spotted on filter paper have been needed. We have tried to make the standard serum for ELISA. At first, the 17 α -hydroxyprogesterone as the first reference material was selected from several marketed reagent grade samples by using various analytical tool such as spectroscopic and chromatographic techniques.

Next, the serum containing 17 α -hydroxyprogesterone have been made, and examined if it could be able to use as the first standard by using various methods mentioned above. From results mentioned in the previous pages, it was suggested the serum made by us will be able to use as the standard serum for ELISA of 17 α -hydroxyprogesterone.

* 昭和大学薬学部 (School of Pharmaceutical Sciences, Showa University)

図 1 標準品及び添血清のマススペクトル

図 2 標準品及び添血清の赤外線吸収スペクトル





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



要約:先天性副腎過形成症(CAH)の新生児マス・スクリーニングに用いられている 17- α -ヒドロキシprogesterone(17-OHP)の測定用 ELISA キットの標準濾紙血液の標準化のための標準血清を作成し、種々の器機的手法を用いて回収率や回収されたものの物性などについて検討した。