

# 先天性副腎過形成をモデルとした先天異常のモニタリングに関する研究

笹 月 健 彦

(東京医科歯科大学・難治研・人類遺伝)

下 澤 和 彦

(東京医科歯科大学医学部小児科)

## はじめに

先天異常のモニタリングのためのモデル疾患として先天性副腎過形成(21-水酸化酵素欠損症:本症)をとりあげ、一昨年度ならびに昨年度の報告書<sup>1)2)</sup>において、その新生児マス・スクリーニングの方法と中間成績について述べた。本年度はそのまとめとして、継続して施行したマス・スクリーニングの成績と新たに開発したより簡便かつ普遍的な<sup>125</sup>Iを用いたRadioimmunoassay(RIA)による方法について報告する。

## I. 対象ならびに方法

### 1. 対象ならびに検体

昨年度と同様に静岡県西部地区をモデル地区とし、昭和56年5月から翌年11月までの約19ヵ月間に出生した新生児20,975名を対象とした。検体は先天代謝異常症などのマス・スクリーニングのための乾燥汚紙血液(汚紙血)からの3mmディスク1コとした。また<sup>125</sup>IによるRIAの基礎的検討には、新生児汚紙血の他に正常小児ならびに治療前あるいは治療中の本症患者も含めた。

### 2. 測定法ならびにマス・スクリーニング法

#### 1) 従来法

実際のマス・スクリーニングの大部分は既報<sup>1)2)</sup>に準じた。その詳細は省略するが、直径3mmのディスク1コに含まれる17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone値(Disc-17-OHP値)を<sup>3</sup>Hを用いたRIAにて測定するものである。

#### 2) マス・スクリーニング法

既報<sup>2)</sup>に準じて行った。何らかの理由でプロトコールに満たなかったものについては問診などにより可能な範囲で評価した。

#### 3) <sup>125</sup>Iを用いたDisc-17-OHP値の測定

##### i) 直接法

マス・スクリーニングに用いている方法と同様に汚紙血溶出液を抽出せずに直接測定するも

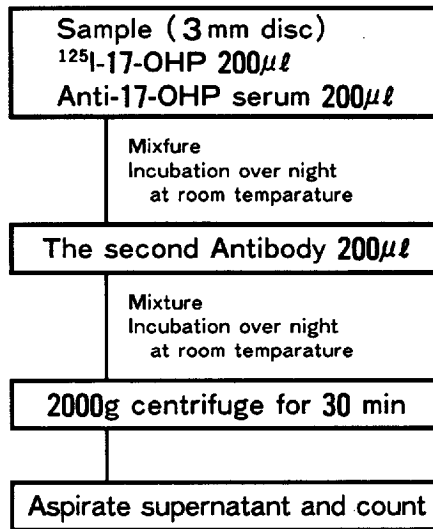


図1 Assay procedure of direct method

のであり、その特異性については若干の難点を認めるものの、簡便性を考慮すれば有用な方法といえる。

図1にその概略を示した。まず標準曲線用の、あるいは検体の3 mm ディスク1コを至適濃度の $^{125}\text{I}$ -17-OHP溶液(栄研ICLの提供による)の200(あるいは250)  $\mu\text{l}$ と抗17-OHP-3-CMO-BSA血清(帝国臓器製薬製)の80,000(あるいは100,000)倍希釈液200(250)  $\mu\text{l}$ の混和液中に一晩溶出・反応させ、続いてそこに第2抗体(山羊抗家兔 $\gamma$ -グロブリン血清)の200(250)  $\mu\text{l}$ を加え混和し、3時間ないし一晩放置後2,000 G 30分間遠心し沈澱物の放射能活性を測定した。

## ii) 抽出法

検体溶出後、溶出液をエチルエーテルにて抽出する方法である。これにより新生児期には高濃度とされる $17\alpha$ -hydroxypregnenolone-sulfate (17-OH- $\Delta^5$ P-S), pregnenolone-sulfate ( $\Delta^5$ P-S)やdehydroepiandrosterone-sulfate (DHA-S)などの硫酸塩が除かれ、特異性の高い測定が可能となる。

図2にその概略を示した。RIA用試料の作製は下記の通り行った。すなわち標準曲線用ディスク1コならびに検体の適当量(血中濃度により1/40~4ディスク)を溶出したホウ酸緩衝液にエチルエーテル4~5 mlを加え、30秒間vortex mixerにて激しく混和する。Emulsionが生ずることが多いため、4°C, 2,000 Gにて5分間遠心後下層の溶出液を除去し、蒸留水0.5 mlを加え10秒間混和しエーテル層を水洗する。再度4°C, 2,000 Gにて5分間遠心後、上層のエーテル層を小ガラス試験管に移し、減圧乾固し試料とした。上記抽出操作の回収率は $95.4 \pm 3.16\%$ と十分であり、硫酸塩の混入は2%以下であった。その後のRIAは直接法と同様に行

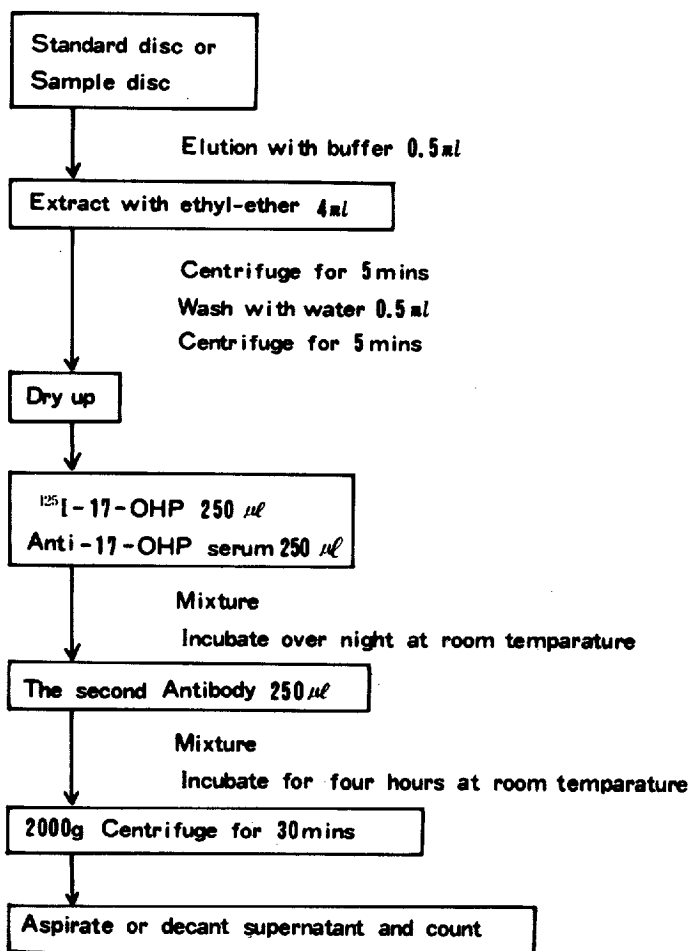


図2 Assay procedure of Disc-17-OHP concentrations by ethyl-ether extraction method using  $^{125}\text{I}$ -17-OHP

った。

## II. 成 績

### 1. マス・スクリーニング

図3に、対象の新生児20,975名のうち $^3\text{H}$ による従来法にて測定した19,948名のDisc-17-OHP値の分布を示した。その平均値と標準偏差はおのおの21.1 pg/discと9.65 pg/discであった。要精検者は20,975名中219名(1.04%)であり、このうち精密検査に応じたものは136名で受診率は62.1%であった。しかし非受診者83名のうち低出生体重児は46名と半数以上を占め、受診率は必ずしも低くはないと思われた。マス・スクリーニング期間中に本症と診断されたものは2人であり、ともに食塩喪失型であった。他の134名については、生後3ヵ月~1才

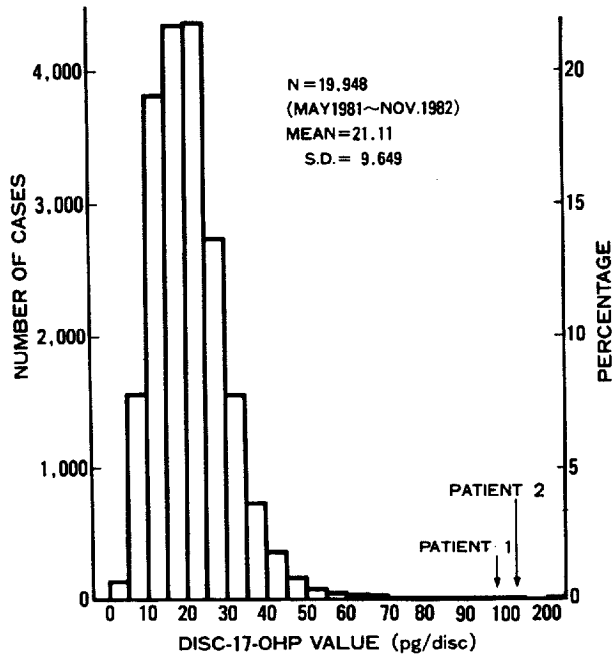


图 3 Distribution of neonatal Disc-17-OHP determinations by direct method using  $[^3\text{H}]17\text{-OHP}$

表 1 Clinical and laboratory data of patients

	Y.S.	K.T.
Age in days	31	27
Genetic sex	Male	Female
Regal sex	Male	Male
Family history	(+)	(-)
Genital ambiguity	(-)	(+)
Vomiting	(±)	(-)
Diarrhea	(-)	(+)
Dehydration	(±)	(#)
Poor weight gain	(+)	(##)
Hyponatremia (mEq/l)	(+) (120)	(+) (118)
Hyperpotassemia (mEq/l)	(+) (5.9)	(+) (5.4)
Hypochloremia (mEq/l)	(+) (88)	(+) (94)
Disc-17-OHP	Direct (pg/disc)	99.0* <sup>1</sup> →988* <sup>2</sup>
	Extraction (ng/ml)	165* <sup>1</sup> →192* <sup>2</sup>
Serum 17-OHP (ng/ml)	270* <sup>3</sup>	245* <sup>4</sup>

\*<sup>1</sup> at initial screening, \*<sup>2</sup> at recall (or second screening)

\*<sup>3</sup> at 31-day old by RIA, \*<sup>4</sup> at 37-day old by HPLC

の時点では正常と考えられた。

## 2. 本症患者ならびに要精検者について

### 1) 本症患者について

表1に、診断された本症患者2例の臨床的ならびに検査所見を示す。

第1例の男児は姉が食塩喪失型の本症患者であるにもかかわらず、皮膚色素沈着、嘔吐などの典型的な本症の臨床症状に乏しく Recall 時まで放置されていたものであり、受診時にはすでに明らかな電解質異常を示していた。生後5日での Disc-17-OHP 値は抽出法ですでに  $165 \text{ ng/ml}$  と高値であり、生後31日では血漿にて  $270 \text{ ng/ml}$  と著しい高値を示していた。

第2例の女児は出生時より半陰陽 (Genital ambiguity) を認め、法的性が男児とされている。生後18日より下痢が出現し、生後27日には脱水著明で聖隷浜松病院小児科に入院。この時点で、第1例と同様に皮膚色素沈着、嘔吐は認めなかったが、体重減少、酸血症ならびに電解質異常を認め、adrenal crisis の状態と考えられた。血中 17-OHP は生後5日で抽出法にて  $58.5 \text{ ng/ml}$  と高値で、生後37日では血漿にて  $245 \text{ ng/ml}$  と著しい高値を示していた。

なお2症例ともに診断後、糖質ならびに鉍質コルチコイドと食塩の投与により順調に成長しており、第2例では法的性の変更を行う予定である。

### 2) 疑陽性者について

昨年度の報告書<sup>2)</sup>において、疑陽性を示す要因には新生児の未熟性ならびに周産期におけるストレスがあることを指摘した。表2に疑陽性者の出生体重、在胎週数、分娩時ならびに早期新生児期における異常の頻度を示したが、出生体重が  $2,500 \text{ g}$  未満あるいは在胎週数が37週以下のものが約半数を占め、また周産期に何らかの異常を認めたものも82.1%と高頻度であり同様の傾向が確認された。

表2 Problems at delivery and during early neonatal period in recalled infants

	Male	Female	?	Total
(I) Birth weight $2,500\text{g}>$	45	39	2	86/210(41.0%)
(II) Gestational age $37\text{weeks}\geq$	20	21	0	41/116(35.3%)
(I) and/or (II)	48	47	2	97/210(46.2%)
(III) Problems at delivery	45	40	0	85/117(72.6%)
(IV) Problems during early neonatal period	14	16	0	30/116(25.9%)
(III) and/or (IV)	49	47	0	96/117(82.1%)

図4には本症患者も含めた要精検者の Disc-17-OHP 値の変化を示した。第1回目の検査で高値を示したものの多くでは、第2回目以降には低下し疑陽性者であることが確認された。し

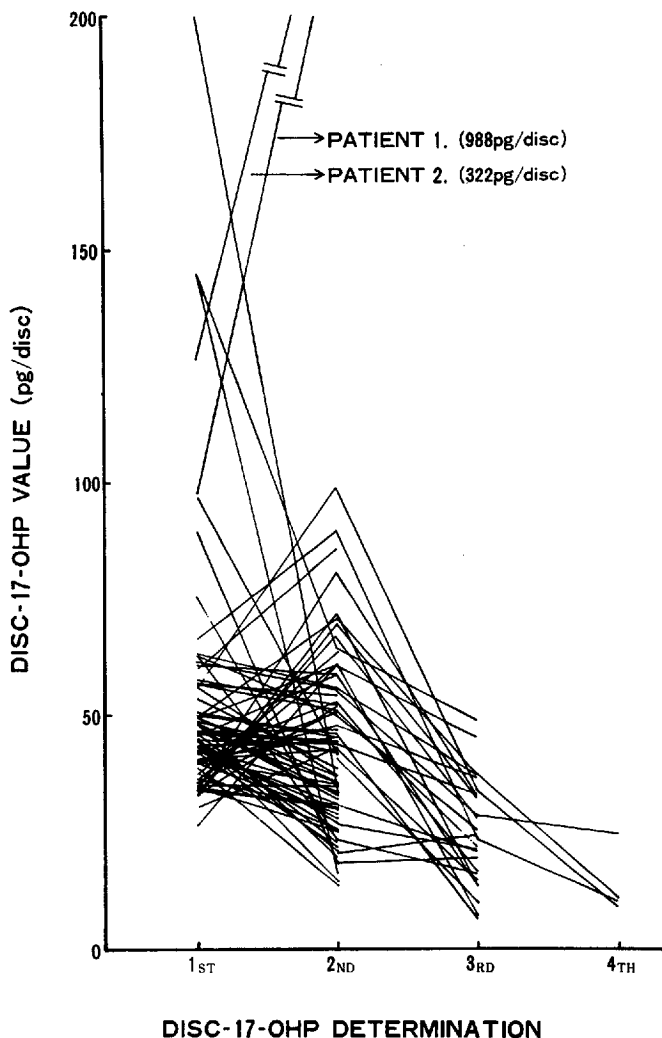


図4 Changes of "Disc-17-OHP" values of recalled cases during infancy

かし一部の新生児では第2回目（生後1ヵ月前後）には逆に軽度ながら上昇を示し、経過観察を必要としたが、第3回目以降にはほぼ全例に低下を認め、結果的に疑陽性者と判断した。一方本症患者は2例とも第2回目にて著しい上昇を示し、疑陽性者とは明らかに区別された。

### 3. $^{125}\text{I}$ による RIA

#### 1) 基礎的検討

直接法、抽出法ともにその詳細については省略するが、標準曲線、希釈試験、正確度、精度についてはほぼ満足できるものであった。

直接法による Disc-17-OHP 値と  $^3\text{H}$  による血漿 17-OHP 濃度との相関（図5）ならびに  $^3\text{H}$  による Disc-17-OHP 値（直接法）との相関（図6）は、それぞれ  $r=0.6509$  ( $p<0.005$ )

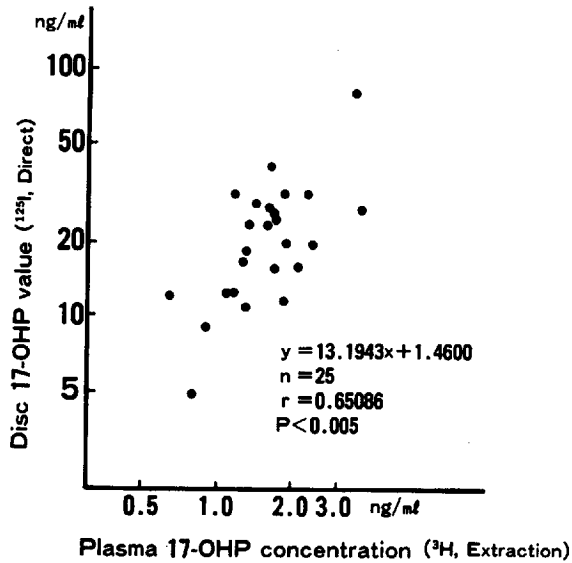


図5 Correlation between plasma 17-OHP concentration by <sup>3</sup>H method with extraction and Disc-17-OHP value by <sup>125</sup>I method without extraction

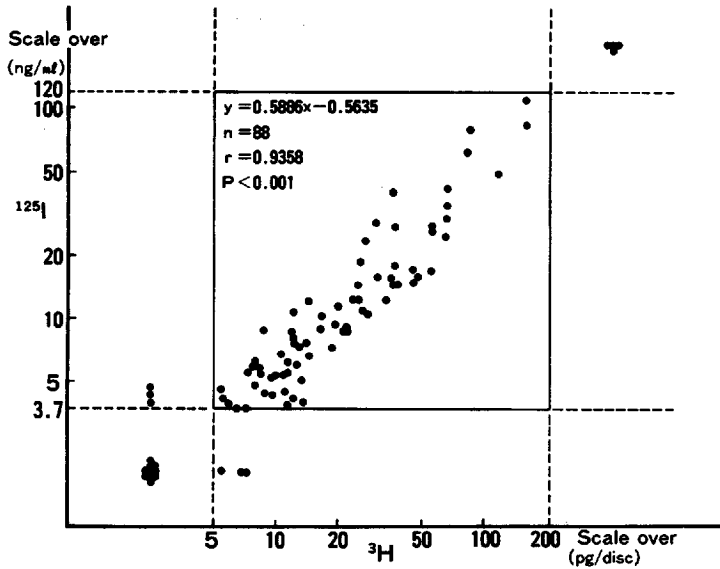
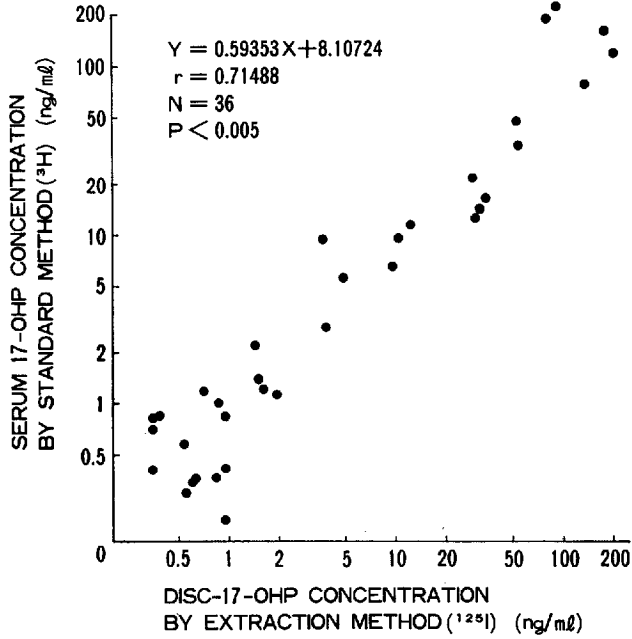


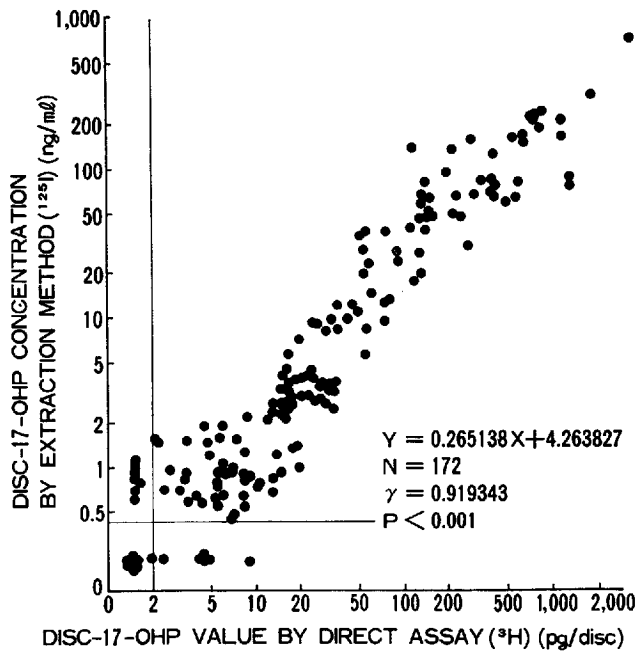
図6 Correlation between Disc <sup>125</sup>I and Disc <sup>3</sup>H

ならびに  $r = 0.9358$  ( $p < 0.001$ ) と満足できるものであった。

また抽出法による Disc-17-OHP 値と <sup>3</sup>H による血漿 17-OHP 濃度との相関 (図7) ならびに <sup>3</sup>H による Disc-17-OHP 値 (直接法) との相関 (図8) も、それぞれ  $r = 0.7149$  ( $p < 0.005$ ) ならびに  $r = 0.9193$  ( $p < 0.001$ ) と満足できるものであった。ことに抽出法について



☒ 7 Correlation between Disc-17-OHP concentrations by ethyl-ether extraction method ( $^{125}\text{I}$ ) and serum 17-OHP concentrations by standard method without chromatography ( $^3\text{H}$ ) in patients with CAH.



☒ 8 Correlation between Disc-17-OHP values by direct method ( $^3\text{H}$ ) and Disc-17-OHP concentrations by ethyl-ether extraction method ( $^{125}\text{I}$ ) in patients with CAH.



表3 Disc-17-OHP values by <sup>125</sup>I-RIA

Subject	With extraction (ng/ml)	Without extraction (ng/ml)
Neonates	1.832±0.813 (n=50)	10.3±7.4 (n=200)
Normal children	1.157±0.381 (n= 8)	37.8±2.93 (n=41)
CAH Y.D.	854.0	S.O.
Y.S.	214.8	S.O.
D.S.	491.0	S.O.
M.S.	192.5	N.E.
K.T.	143.0	S.O.

S.O. : Scale over

N.E. : Not examined

は <sup>125</sup>I ではやや高値をとる傾向を認めるものの、血漿濃度とほぼ同等に評価できた。

<sup>125</sup>I による Disc-17-OHP 値を表3に示す。生後5日前後の新生児の直接法ならびに抽出法による測定値は、おのおの10.3±7.4 ng/ml, 1.832±0.813 ng/mlであり、治療開始前の本症患者のそれは直接法では1例(M.S.)の未検を除き全て scale-over であり、抽出法では143~854 ng/mlと著しい高値を示していた。

### Ⅲ. 考 按

乾燥汚紙血液中の17-OHPを測定し、新生児期に本症のマス・スクリーニングを行う試みは、現在までいくつかの地域で行われてきた。Pangら<sup>3)</sup>はAlaska地方にて約30ヵ月間に19,677名の新生児マス・スクリーニングを行い、5名の本症患者を発見し、Yupik Eskimoでの発生頻度(遺伝子頻度)は1:282(0.059)、Caucasianでは1:13,733(0.0077)であった。またCacciariら<sup>4)</sup>はEmilia-Romagna地方(Italy)にて42,930名中に5名を発見し、heterozygous carrierは約1/50であるとし、さらに発見された患児には外陰部の男性化徴候の乏しい女兒も含まれていたことから、女兒における本症のマス・スクリーニングの必要性も指摘した。われわれの19ヵ月間の成績では20,975名中に2名の食塩喪失型の本症の発生を確認でき、わが国においても先年まとめられた実態調査報告<sup>5)</sup>にある約1/44,000より高頻度である可能性が示唆された。なお現在札幌市では行政レベルで本症のマス・スクリーニングが施行されており、約17,000人に1名の本症が発見されている<sup>6)</sup>。

マス・スクリーニング施行に当っては、その男女比の差異<sup>5)</sup>より単純男性化型の男児の発見が興味あるところであった。現在までのところこの病型は発見されていないが、本症と確認された2症例ともいわゆる危険因子(家族歴あるいは半陰陽)を有していたにもかかわらず他の典型的(古典的)な症状に乏しく一般医家にては診断の困難な症例であったことは注目すべき

ことであり、本症型においてもマス・スクリーニングの必要であることが再確認された。

疑陽性率はいわゆる cut-off point の値により規定される。われわれは Recall の基準として、本マス・スクリーニングが試験的なものでありかつ同時に heterozygous carrier も同定される可能性も期待されたことより、99th-percentile 以上とした。結果的に疑陽性率は 217/20,975 (1.03%) と高率であり、一方 heterozygous carrier を疑われるものが少数ながら推定できたのみでその確認までは至っていない。確認の方法としては現段階では、生後のある時期を定めて ACTH 負荷試験<sup>7)</sup>を行い、血中 17-OHP や 21-deoxycortisol あるいはそれらの尿中代謝産物である pregnanetriol や pregnanetriolone を測定する方法が考えられるが、いまだ実施上困難であるといわざるを得ない。

疑陽性者に未熟児あるいは周産期に何らかの合併症を有するものが多いことは、先の Pang ら<sup>3)</sup> ならびに Cacciari ら<sup>4)</sup> も指摘している。これらの要因として胎児副腎皮質遺残の影響(例えば 17-OH- $\Delta^4$ P-S,  $\Delta^4$ P-S ならびに DHA-S の高値あるいは 17-OHC それ自体の高値)やストレスによる副腎皮質の過剰刺激状態が示唆されるが、胎児-胎盤系を含めた胎児ならびに新生児期の副腎皮質の発達生理の詳細な検討が必要となろう。

現行の <sup>3</sup>H による Disc-17-OHP 値の測定では、放射性物質ならびに検査自体の経費と労力の点で多々問題があり、より簡便かつ経済的な方法、具体的には <sup>125</sup>I や酵素免疫測定法の開発が望まれてきた。前者についてはわれわれの検討によりすでにマス・スクリーニングに応用可能な段階となり、後者については荒川ら<sup>8)</sup> により開発され、現在その変法により札幌市を対象地区としたマス・スクリーニングが施行されるに至った<sup>9)</sup>。

#### IV. 結 語

先天異常のモニタリングのモデル疾患として、その実態把握の上でも早期発見・治療のきわめて重要な 21-水酸化酵素欠損症をとりあげ、そのマス・スクリーニングの方法、成績ならびに問題点について述べた。診断された2症例がともに危険因子を有しながら診断の遅れた症例であったことは、本症の病態ならびに症候学の普及もさることながら、客観的な laboratory data によるマス・スクリーニングの重要性を示唆するものであろう。

#### 文 献

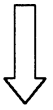
- 1) 笹月健彦, 他: 厚生省心身障害研究, 先天異常のモニタリングに関する研究班, 昭和55年度研究報告書, p. 154~163, 1981.
- 2) 下澤和彦: 厚生省心身障害研究, 先天異常のモニタリングに関する研究班, 昭和56年度研究報告書, p. 175~182, 1982.
- 3) Pang, S. et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab., **55**: 413~420, 1982.
- 4) Cacciari, E. et al.: Lancet, **1**: 1069, 1982.
- 5) 諏訪城三, 他: 日児誌, **85**: 204~210, 1981.

- 6) 松浦信夫：私信.
- 7) 齊藤喜親：お茶の水医誌，**28**：117～125，1980.
- 8) Arakawa, H. et al. : Chem. Pharm. Bull., **30**：3036～3039，1982.



## 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



はじめに

先天異常のモニタリングのためのモデル疾患として先天性副腎過形成(21-水酸化酵素欠損症:本症)をとりあげ、一昨年度ならびに昨年度の報告書において、その新生児マス・スクリーニングの方法と中間成績について述べた。本年度はそのまとめとして、継続して施行したマス・スクリーニングの成績と新たに開発したより簡便かつ普遍的な  $^{125}\text{I}$  を用いた Radiomunoassay(RIA)による方法について報告する。