

先天性副腎過形成症のスクリーニング

国立武蔵療養所神経センター

診断研究部 成瀬 浩
鈴木 恵美子

昭和大学薬学部

薬品分析 辻 章 夫

研 究 目 的

先天性副腎過形成症（以下CAH）のスクリーニングに関しては、クレチン症の場合とかなり異った状況にある。スクリーニングにより、疑わしい例が発見された場合に、精密検査を行うことは、かなり高度の知識技術を必要とし、専門家の数も限られている。同一地区内に専門家が存在せず、他の地区に紹介することが必要となることもある。従ってCAHスクリーニングの全国的実施を可能とするためには、1) 汗紙血を用いた信頼性の高いスクリーニング方法の開発。2) 疑陽性となった検体について、詳しく分析しうる方法を樹立すること、の2点が必要である。われわれは、このために、17-ハイドロキシprogesterone（以下17-OHP）を汗紙血中で測定し得る酵素免疫測定法（EIA）の開発、汗紙血の薄片（3mm ディスク1～2ヶ）を用いて、血中ステロイドの一際分析が可能であり、しかも、どこでも実施しやすい方法の開発、汗紙血中のコルチゾールの正確な定量法の開発を目指して、研究を行っている。今年度は、この中で17-OHPのEIAの研究に関して報告を行う。

研 究 方 法

CAHのスクリーニングに、汗紙血を用いて17-OHPを測定することが必要であるという点に関しては、まだRIAの方法も確立されたとは言い難い。従って、われわれは、EIAによる方法を実施することを目的とした。17-OHP抗体は神戸川氏より分けて頂いたものを使用した。17-OHPとhorse radish peroxidase のコンジュゲートを作り、第2抗体固相化ビーズを用いることとした。¹⁾ 3mm ディスク1枚に抗17-OHP抗体、緩衝液、ビーズを加え、4℃で17時間放置し、翌日に17-OHP-HRPコンジュゲートを入れ、室温で2時間放置し、その後汗紙と反応液を除き充分洗浄する。それに、酵素活性測定用の基質として、P-hydroxy phenylpropionic acid と過酸化水素を加え、室温で1時間放置後、蛍光を測定する。（波長：320nm, 405nm）。尚、この様に直接3mm ディスクを反応液に加え、測定する方法（以下直接法と称す）と共に、一度3mm ディスク1ヶより0.5 ml の水で17-OHPを抽出し、2 ml のエーテルで17-OHPを抽出する方法（抽出法と称す）をも行っている。

研究結果及び考察

上述のEIA法により、試験管あたり、1 p μ から100 p μ 測定しうる。M. New らによれば、CAHの場合、3 mm ディスク1枚あたり50 p μ がカットオフ値であるので、充分な感度である。一般新生児検体1344名につき、重複測定を行い、相関係数0.81で良好であった。ただ、直接法では、6.5%がディスクあたり50 p μ 以上となった。そこで、新生児検体811名につき直接法で測定した折、50 p μ 以上が、27(3%)となった。この27検体につき、抽出法により再検し、全て50 p μ 以下となり、直接法で高値に出たものも抽出法で再測定すれば、50 p μ /ディスクというカットオフ値で、偽陽性はあまり多くないものと考えた。

ただ、未熟児や出生直後のものでは種々のステロイドが出て、上記の方法でも正確に17-OHPを測定できない可能性も考えられたので、未熟児などで、生後早い時期に採血した特殊検体について、本法で検査を行ってみた。この対象としては、現在、国府台病院産婦人科々長皆川博士らと協力し、千葉県的新生児センターに入院したハイリスク児の血液の分析を行っている

るので、この血液の残りを使用させて頂いた。この対象群の多くは未熟児低体重であり、他に種々の方法で一般婦人科医から送られたものであり、入院直後に採血している。第2図に、このような対象に418件を直接法で測定した結果を示し、第3図には抽出法で測定した結果を図示した。このような未熟性の強い検体、あるいは出生直後(0~3日)に採血したものである、抽出法で測定しても、50 p μ /ディスク以上のものが多いことがわかった。これは、17-OHPの抗体が、未熟なものに多い17-OHP-3-sulfate などとも反応してしまうことが主原因と考えられ、更に他のステロイドとも交叉反応があるためであろう。

そこで、このような418名につき生後7~20日の間に第2回目の採血を行い17-OHPを測定した。但し、全員からは2回目の採血が得られず、212名から第2回目の検体が得られたのみである。この212名について、直接法と抽出法での測定を行った。第4図に結果を示したが、直接法では50 p μ 以上のものが多数存在するが、抽出法では50 p μ 台のものがわずか3件で、あとは全て50 p μ 以下となった。即ち、このように未熟性の強い対象でも、生後一定期間後に採血し、抽出法による測定を行えば、大多数はカットオフ値以下となることがわかったのである。現在の抗体は、まだ多くの物質と交叉反応があり完全ではないが、このような抗体

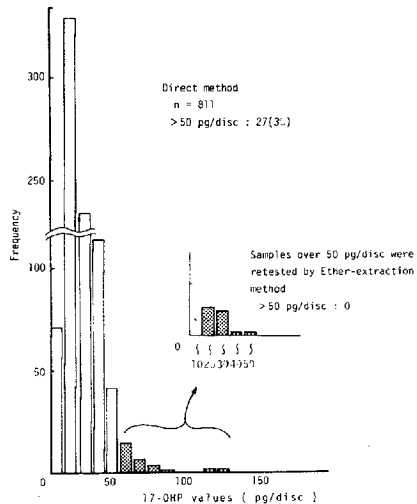


図1 新生児17-OHP分布図

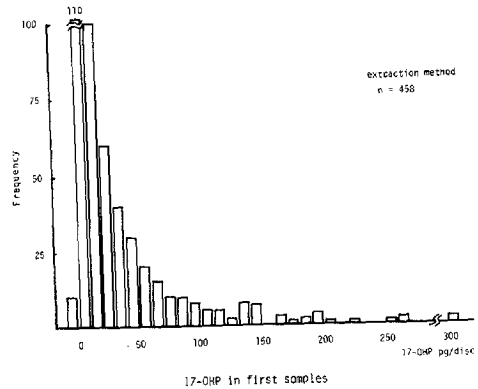
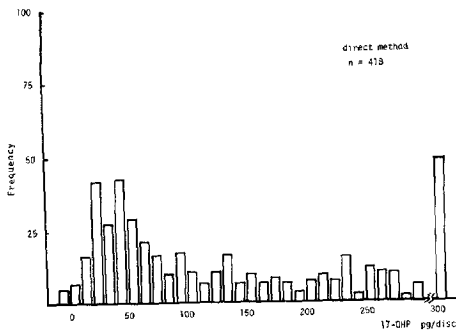


図2 未熟児検体の 17-OHP 分布 (直接法) 図3 未熟児検体の 17-OHP 分布 (抽出法)

を用いて上記のような特殊な対象について研究を行ったのであるが、直接法と抽出法を併用することにより、充分スクリーニングに使用しうることが証明されたと思われる。

一般新生児検体では、直接法で 50 pg/ディスク以上となるのは、数パーセントと考えられる。従って、まず直接法で測定を行い、50 pg 以上のものに対してのみ抽出法による再測定を行うという方法は、実施は容易であると考えられる。

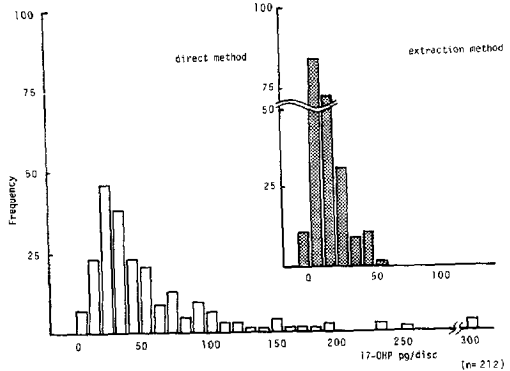


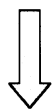
図4 未熟児検体の第2回目採血
血液における 17-OHP 分布図

今後、こうして 17-OHP 高値の患者が

見つかった場合、著しく高い例は直ちに患者の臨床症状、血中 Na K などから塩類喪失型か否かを判断する。そうでない例については、尿紙血中のステロイドの分析を行ない、CAH がかなり疑わしい例に関しては、多少遠い所であっても専門家に紹介するというようなスクリーニングシステムが考えられるのではなかろうか。ただ、正常と異常のカットオフ値、急いで対応すべき例とそうでない例との区別などまだ研究しなければならない点が存在しており、継続研究が不可欠である。

文 献

- 1) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji, H. Naruse, E. Suzuki and A. Kambegawa: Fluorescence EIA of 17-OHP in dried blood spot and its application to mass screening for CAH. Chem. Pharm. Bull 31, 2724 (1983)



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

先天性副腎過形成症(以下 CAH)のスクリーニングに関しては、クレチン症の場合とかなり異った状況にある。スクリーニングにより、疑わしい例が発見された場合に、精密検査を行うことは、かなり高度の知識技術を必要とし、専門家の数も限られている。同一地区内に専門家が存在せず、他の地区に紹介することが必要となることもあろう。従って CAH スクリーニングの全国的実施を可能とするためには、1)ろ紙血を用いた信頼性の高いスクリーニング方法の開発。2)疑陽性となった検体について、詳しく分析しうる方法を樹立すること、の2点が必要である。われわれは、このために、17-ヒドロキシprogesterone(以下 17-OHP)をろ紙血中で測定し得る酵素免疫測定法(EIA)の開発、ろ紙血の小片(3mm ディスク1~2ヶ)を用いて、血中ステロイドの一際分析が可能であり、しかも、どこでも実施しやすい方法の開発、ろ紙血中のコルチゾールの正確な定量法の開発を目指して、研究を行っている。今年度は、この中で 17-OHP の EIA の研究に関して報告を行う。