

酵素免疫測定法による先天性副腎 皮質過形成のマス・スクリーニング

高杉 信男 福士 勝 荒井 修
水嶋 好清 前田 博之 林 英夫

(札幌市衛生研究所)

松浦 信夫 藤枝 憲二

(北海道大学医学部小児科)

研 究 目 的

新生児濾紙血液を用いる 17-OHP 測定法として Pang ら¹⁾ により RIA が, Arakawa ら²⁾ により EIA が開発され, 先天性副腎皮質過形成のマス・スクリーニングが可能となった。

札幌市では昭和57年4月から本症のマス・スクリーニングをEIAにて実施している。そこで, 測定法の基礎的検討と抗体の特異性の点で問題となる直接法と抽出法の比較を行った。さらに, スクリーニングにおけるカットオフ値の検討を行い, スクリーニングシステムの確立を試みた。

研 究 方 法

(1) 対 象

札幌市内で昭和57年4月から昭和58年12月までに出生した新生児37,063例である。

(2) 試薬の調製

第1抗体は抗 17-OHP-3-CMO-BSA 家兎血清 (Medicinsk 社) を直接法で2万倍, 抽出法で3万倍希釈して使用した。

17-OHP-HRP 結合体は Arakawa ら²⁾ の報告に準じて混合酸無水物法で作製し使用時1万倍希釈した。

第2抗体固相化ビーズは山羊抗家兎 IgG 血清-IgG フラクション (Milse 社) を ポリアセタールビーズ $6 \times 5 \mu\text{m}$ (富士レビオ社) に吸着させて作製した。

(3) 測定方法 (図1)

直接法は 3 mm ディスク1枚, 0.05 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) 0.3 ml , 抗 17-OHP 血清 0.1 ml , 第2抗体ビーズ1個を加え一夜 4°C で反応させ, 17-OHP-HRP 結合体 0.1 ml 加え 25°C で2時間反応後ビーズを生理食塩水 2 ml で3回洗浄し, 3-(P-Hydroxyphenyl) Propionic acid と H_2O_2 を基質として HRP 活性を測定した。抽出法は 3 mm ディスク1枚にリン酸緩衝液 0.2 ml 加えて室温で2時間溶出後エーテル 2 ml で抽出し遠心分離後エーテル層を分取し蒸発乾固させて以下直接法と同様に行った。

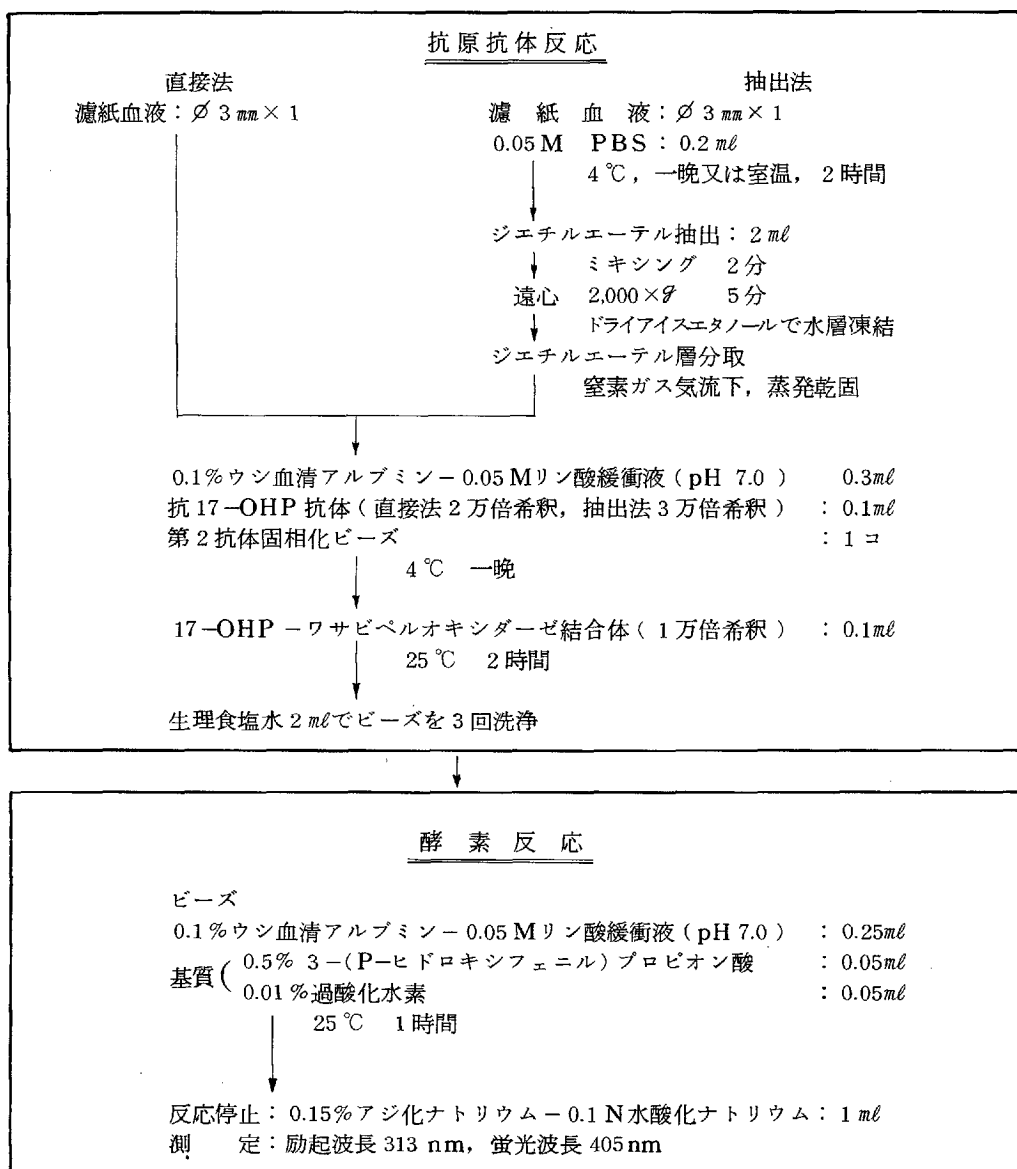


図1. 濾紙血液 17-OHP 測定法

研究結果および考察

(1) 測定感度および再現性

本法の測定感度は 0.5 ng/ml であり， 100 ng/ml まで測定可能であった。また，測定内変動係数は 6～12%，測定間変動係数は 9～13% と良好な再現性が得られた。これより本法はスクリーニングに十分使用できると考えられる。

(2) 直接法と抽出法との比較

直接法による 5,093 例と抽出法による 5,492 例のスクリーニングではそれぞれの平均値±標準偏差は 7.7 ± 2.9, 2.1 ± 1.9 ng/ml と直接法で 3 倍以上の高値を示した(図 2)。これは新生児血中に大量に含まれる 17α-OH-Pregnenolone-Sulfate との交叉反応によるものと考えられ、大量の検体を取扱うマス・スクリーニングでいずれの方法

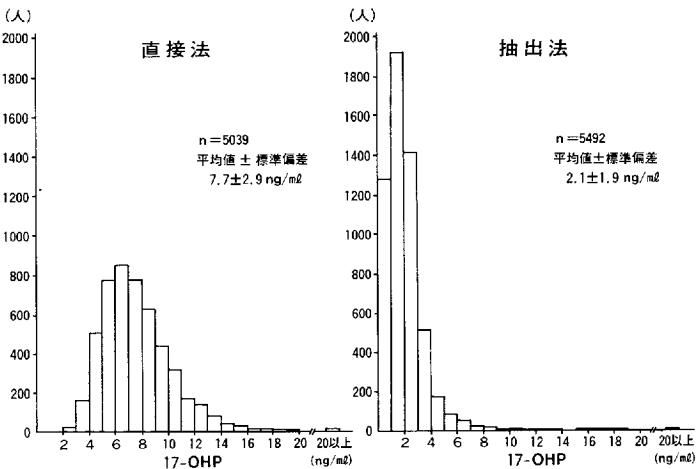


図 2. 新生児濾紙血液 17-OHP 値のヒストグラム

で行うか、抽出操作の自動化、特異性の高い抗体の作製も含めて今後検討が必要である。

(3) カットオフ値と再検率の比較

新生児 15,905 例のスクリーニングでカットオフ値を 5, 6, 7, 8, 9, 10 ng/ml とするとそれぞれの再検率は 0.92, 0.58, 0.40, 0.34, 0.21, 0.18 % となった(表 1)。カットオフ値 9~10 ng/ml での再検率は、Pang らの 0.14 %³⁾, Cacciari らの 0.2 %⁴⁾ とほぼ一致し、現在われわれが用いている 5 ng/ml で下沢らの 1.04 %⁵⁾ とほぼ一致した。患児の検出率はいずれも 7,000~15,000 人に 1 人であり、カットオフ値は 8~10 ng/ml が適当と考えられる。

表 1. カットオフ値と再採血率の比較

カットオフ値 17-OHP (ng/ml)	再 採 血 率 (%)
5	0.92
6	0.58
7	0.40
8	0.34
9	0.21
10	0.18

(4) マス・スクリーニング結果

昭和57年4月から昭和58年12月までに 37,063 例のスクリーニングを行った結果、2 例の本症患児を発見した。要再採血数は 465 例(1.25%)であり、初回測定で異常高値を示した患児 2 例を含む 36 例が精査の対象となった(表 2)。発見された患児 2 例の 17-OHP 値は日令 5 で 440 ng/ml,

表 2. 先天性副腎皮質過形成のマス・スクリーニング結果

期 間	カットオフ値	スクリーニング数	再採血数	精査数	患者数
昭和57年4月 昭和58年3月	97パーセンタイル/+3SD	21,158	318(112)※ (1.50%)	30(7)※ (0.14%)	1
昭和58年4月 昭和58年12月	97パーセンタイル/5ng/ml	15,905	147(55)※ (0.92%)	6(0)※ (0.04%)	1
合 計		37,063	465(167)※	36 (1/18, 532)※※	2

※ 低出生体重児 ※※ 発生頻度

日令6で200 ng/mlと異常高値であった。精査で正常となった34例は日令5～10の初回採血で4～25 ng/ml, 日令10～20の再採血で4～30 ng/mlであり, 精査時から経過観察中の日令15～60で全例正常となった(図3)。

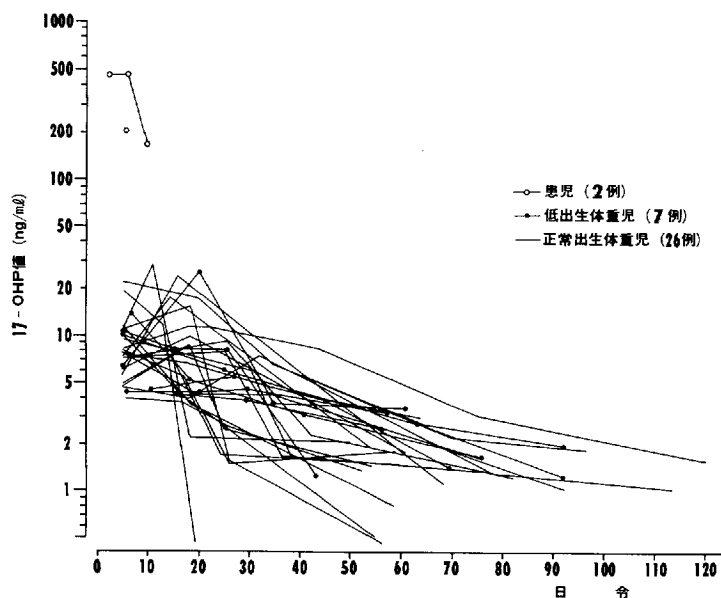


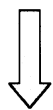
図3. 要精密検査児における17-OHP値の推移

結 語

- (1) EIAによる濾紙血液17-OHPの測定は簡便で信頼性があり, 特殊な施設を必要としないことからCAHのマス・スクリーニングに適している。
- (2) スクリーニングでは血中17-OHPを反映する抽出法が良いが, 自動化の検討が必要である。
- (3) 本症の発生頻度は従来の報告よりも高く早期発見のためのスクリーニングの重要性が確認された。

文 献

- 1) Pang, S., et al : J. Clin. Endocrinol. Metab., 45 : 1003, 1977.
- 2) Arakawa, H., et al : Chem. Pharm. Bull., 31 : 2724, 1983.
- 3) Pang, S., et al : J. Clin. Endocrinol. Metab., 55 : 413, 1982.
- 4) Cacciari, P., et al : Hormone Res., 16 : 4, 1982.
- 5) 下沢和彦 : 日内秘会誌, 59 ; 1860, 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

新生児濾紙血液を用いる 17-OHP 測定法として Pang らにより RIA が³, Arakawa らにより EIA が開発され,先天性副腎皮質過形成のマス・スクリーニングが可能となった。

札幌市では昭和 57 年 4 月から本症のマス・スクリーニングを EIA にて実施している。そこで,測定法の基礎的検討と抗体の特異性の点で問題となる直接法と抽出法の比較を行った。さらに,スクリーニングにおけるカットオフ値の検討を行い,スクリーニングシステムの確立を試みた。