

先天性副腎過形成症スクリーニングのための EIA 法の改良

成瀬 浩¹⁾, 鈴木恵美子²⁾, 熊田淳子¹⁾, 辻 章夫³⁾, 塚田和宏⁴⁾

1) 国立武蔵療養所神経センター 2) 日本公衆衛生協会 3) 昭和大学薬学部 4) 三共製薬中央研

1) はじめに

先天性副腎過形成症 (CAH と略) のスクリーニングは、今後全国的に取り上げられることが必要であると考えられる。全国実施のためには、どこでも実施しやすい方法が必要であり、それを考えるとラジオイムノアッセイ (RIA と略) よりも酵素免疫測定法 (EIA と略) の方がより有効である。さらに、EIA を広く新生児スクリーニングに応用するためには、高感度化および方法の簡易化が重要である。われわれは、EIA による CAH のスクリーニング法の改良研究を行ない、さらに旧法および改良法のマススクリーニングへの応用について検討を行なったので報告する。具体的には、まず昨年引き続き horse radish peroxidase (HRP と略) を用いた EIA 法により 17-(α) hydroxyprogesteron (17-(α) OHP と略) 測定して、ハイリスク児についてスクリーニングを行なった。さらに、glucose oxydase (GOD と略) を用いる 17-OHP 測定の EIA の開発改良を行ない、この方法のスクリーニングへの応用についても検討した。

2) HRP を用いた 17-OHP 測定法によるスクリーニング

第 2 抗体ビーズ固相法を用い、HRP を標識酵素とする 17-OHP 測定 EIA 法により、ハイリスク児についてのスクリーニングを行なった。これは、一部の専門家の間で、CAH の重症例は生後早い時期にショック状態になり死に至ることも考えられるので、生後 4~7 日目の採血検体を用いる新生児スクリーニングが有効であるか疑問だという意見があったので、この様な事実の有無を検討するためである。

現在までに、千葉県未熟児センターの先生方の協力を得て、未熟児センターに入院した低体重児やその他の症状をもつハイリスク児 1400 人について入院直後に採血し検査を行なった。その結果、CAH により生後早期に死亡した例は発見されていない。従って、本疾患についても一般

新生児と同時期のスクリーニングが可能と考えられる。

表 1 17-OHP 50 pg/disc 以上の検体数

出生時体重(g)	第 1 回目採血時	第 2 回目採血時
2500 以上	55 (14.3%)	2 (0.7%)
2499 ~ 1500	105 (38.9%)	5 (2.2%)
1499 以下	50 (51.0%)	6 (10.3%)
2500 以下	15 (35.7%)	0 (0%)

表 1 にこのデータのまとめを示した。第 1 回目採血は生後 1~2 日目、第 2 回目採血は生後 5 日以上経過し哺乳などの状態が良かった時点で採血を行なったものである。生後まもなく採血した第 1 回目の結果では、エーテル抽出処理を行なっても 1000g 以下の極小未熟児では、17-OHP が高値を示すものが

多い。しかし、第2回目では、多くは正常範囲となり、数%のものが 50 pg/disc 以上を示した。この検体を追跡した結果、全例で 17-OHP が正常に戻ったことが判明している。早期に正確な測定を行ない、さらに、false positive を少なくするには cross reaction のより少ない反応系を開発するか、あるいは濾紙血を用いての chromatography などによる正確な定量方法の併用が望ましい。

3) GOD を用いる新しいスクリーニング方法の改良と応用

EIA 法を新生児スクリーニングに応用するためには、高感度化および方法の簡易化が重要と考え、辻らが発表した GOD を標識酵素とする 17-OHP の EIA を改良し、マススクリーニングへの応用について検討を行なった。

【方法】

今回の検討には精製第2抗体を試験管に coating した系を用い、GOD と 17-OHP との conjugate は辻らの方法により作製し、17-OHP 抗体は帝国臓器提供のものを用いた。酵素活性の測定には、glucose を基質とし生成する H_2O_2 を HRP-4-hydroxy phenyl acetic acid (HPAA) 系による蛍光測定を行なった。また、この分析系を用いると一部の試薬を変えることにより T4 測定も可能であり、さらに TSH の EIA と組み合わせて、1検体内での TSH と 17-OHP の同時測定も可能と考えられる。

【操作法】

第2抗体を coating した試験管に 3 mm ディスク 1 枚を入れ、第1抗体・conjugate を各々 100 μ l、緩衝液 300 μ l を加える。4 $^{\circ}$ C にて1夜放置後、洗浄し、glucose 基質液 500 μ l、HPAA、HRP 各 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で2時間放置する。反応停止液を加えた後、励起波長 313 nm、測定波長 405 nm にて測定を行なった。

【結果と考察】

17-OHP の標準曲線を示した(図1)。ディスク 1 枚で 10 ~ 250 pg/disc の 17-OHP が測定可能である。10 pg/disc の B/Bo が 75%、50 pg/disc が 45%、250 pg/disc が 20% であり、HRP を標識酵素とした方法に比べ測定範囲がやや広がっている。

17-OHP 測定時の再現性について表2に示した。測定時の平均が 50 pg/disc 付近の sample

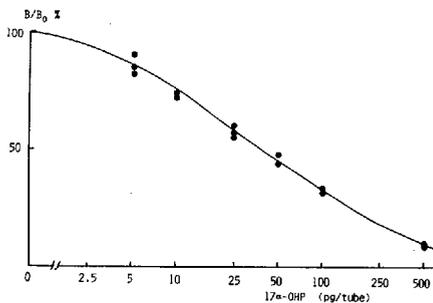


図1 17-OHP の標準曲線

表2 再現性

	n	17 α -OHP pg/disc mean \pm S.D.	C.V.(%)
Intra assay			
sample 1	10	46.80 \pm 2.61	5.6
sample 2	10	98.50 \pm 10.60	10.8
Inter assay			
sample 1	10	45.90 \pm 4.55	9.9
sample 2	10	100.93 \pm 12.86	12.7

1の測定内変動は5.6%、100 pg/disc 付近の sample 2 では10.8%であり、また測定間変動は、sample 1では9.9%、sample 2では12.7%であった。このように再現性についてはやや問題がある様で、分析系の改善が望ましいと考えている。

以前、第2抗体を coating する方法や材質により測定感度や再現性が大きく変動することを経験したので、coating に関する検討を行なった。第3表には、試験管による測定感度や再現性の差についての検討結果を示した。今回6種類の試験管を用いて、4℃、15℃、室温、37℃の条件にて第2抗体を試験管に coating した。そして、0、5、50、500pg/disc の血液濾紙を測定し、B/Bo の値と各濃度の蛍光強度の変動について比較を行なった結果、coating 温度による差はあまりなかったが、材質やサイズ、メーカーによる差が見られた。表には、検討を行なった6種類の試験管のうち4種類についての結果を示した。A社-1の内径6.6mmの試験管で

表3 試験管による差異

Incubation; overnight at 37°C								
17OHP stand.	A Co.tube-1 6.6x50mm		A Co.tube-2 6.6x50mm		A Co.tube-3 9x85mm		B Co.tube 10x80mm	
pg/disc	B/Bo	CV%	B/Bo	CV%	B/Bo	CV%	B/Bo	CV%
0		2.3		5.2		1.4		2.7
5	72	8.1	67	5.7	91	4.0	87	4.4
50	45	7.9	46	2.3	56	2.3	50	3.1
500	10	6.5	10	3.8	21	4.1	18	2.3

は、5 pg/disc の B/Bo が72%、50 pg が45%、500 pgが10%、A社-2では、67%、46%、10%であり、A社-1と同材質で内径9mmのものでは91%、50%、21%、B社では、87%、50%、18%であった。このように感度の面では、径の細い方が良いようであるが、再現性については径の太いもののCV%の方が小さいようである。いずれにせよ、スクリーニング応用のためには、再現性の向上が必要であると考え、tube coating についての検討を現在も続行中である。

本分析系を用い、一般新生児の17-OHP測定を行なった時の分布を第2図に示した。新生児816名について測定した結果、50 pg/disc 以上を示したのは6.4%であり、この検体もエーテル抽出処理を行なって測定すると、すべて50 pg/disc 以下となった。この結果は、HRPを用いたEIAの既報と同様のものであった。

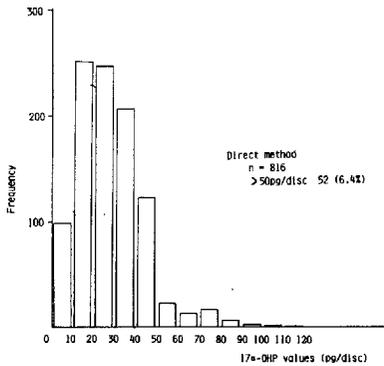


図2 新生児の17-OHP 分布図

以上の結果から GOD を用いた17-OHP 測定のための EIA 法は、再現性にやや問題があるものの、一般新生児のスクリーニングには応用が可能と考えられる。



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



1)はじめに

先天性副腎過形成症(CAH と略)のスクリーニングは、今後全国的に取り上げられることが必要であると考え。全国実施のためには、どこでも実施しやすい方法が必要であり、それを考えるとラジオイムノアッセイ(RIA と略)よりも酵素免疫測定法(EIA と略)の方がより有効である。さらに、EIA を広く新生児スクリーニングに応用するためには、高感度化および方法の簡易化が重要である。われわれは、EIA による CAH のスクリーニング法の改良研究を行ない、さらに旧法および改良法のマススクリーニングへの応用について検討を行なったので報告する。具体的には、まず昨年に引き続き horse radish peroxidase(HRP と略)を用いた EIA 法により 17- α (α)hydroxyprogesteron(17- α (α)OHP と略)測定して、ハイリスク児についてスクリーニングを行なった。さらに、glucose oxydase(GOD と略)を用いる 17-OHP 測定の EIA の開発改良を行ない、この方法のスクリーニングへの応用についても検討した。