

マスキリングに関する研究

(分担研究：副腎過形成症スクリーニングの実施に伴う諸問題の検討)

ELISA法によるhTSHおよび17-OHPの同時アッセイ

辻 章夫*

要約 : 先天性副腎過形成症と先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)の診断の指標となる 17α -ヒドロキシprogesterone(17-OHP)とヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)をELISA法で同時に測定する方法を検討し、スクリーニングの迅速かつ省力化の可能性について検討した。

見出し語 : hTSH, 17-OHP, 同時アッセイ, ELISA法

研究方法 : 本法の原理(図)はhTSHは2種類のモノクローナル抗体(マウス)を用いたサンドイッチアッセイ法で、固相にマイクロタイタープレートを用い、西洋ワサビのペルオキシダーゼ(HRP)を標識酵素としその検出はABTS/H₂O₂を基質とする比色法で測定した。一方、17-OHPは抗家兎IgG(ヤギ、第二抗体)をTSPプレート(凸型)に固相化し抗17-OHPとHRP標識17-OHPを用いた競合法で検出はhTSHと同様にABTS/H₂O₂を用いて比色する。
[アッセイ法] ウェルに直径3mmの乾燥濾紙血液disc1枚を入れ、抗hTSH

H、抗17-OHP、17OHP-HRPを加え、TSPプレートで覆い、4°C一夜免疫反応する。ウェルの壁およびTSPプレートの表面をそれぞれ緩衝液洗浄後、ウェルに基質を加え、TSPプレートの場合は別のプレートウェル中で基質と反応後、NaN₃を含む液で反応を停止させ、415nm/492nmでの吸光度を測定する(Titertek Multi-scan PLUS)。

結果 : 種々の条件検討の結果の最適条件でのhTSHの検量域は0.5~80 μ U/mlで、その精度は日内では

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

n=6で3.2~6.8%、日間ではn=3で4.0~9.5%であった。

17-OHPについては検量域は1~300 ng/mlであり、その精度は日内ではn=6で2.2~7.6%、日間ではn=3で3.5~13%であった。それぞれ相互の干渉はなく、他法との相関も良好であった。

hTSHはRIAと $r=0.96$ (n=50)、17-OHPはエンザプレートN-17-OHP法と $r=0.80$ (n=64)の相関が得られた。

プレリミナリーな測定として神奈川県予医学協会および東京都予防医学協会提供の一般検体について、本法で測定した。

考察 : 本法はhTSH, 17-OHP相互の干渉はなく、再現性よく両者の測定が可能であった。本法により、直径3mmの乾燥血液濾紙1枚で2成分が同時にアッセイできることから、スクリーニングの迅速化、省力化に貢献すると思われる。なお、本方法についてのレポートは臨床化学に投稿受理されている。

文献

- 1) M.Maeda et al; J. Immunol. M., 82, 83 1985.
- 2) M.Maeda et al; Clin. Chem., 23, 761, 1987.
- 3) 辻章夫他: 薬学雑誌, 107, 150, 1987.
- 4) 大熊博他: 臨床化学, 印刷中.

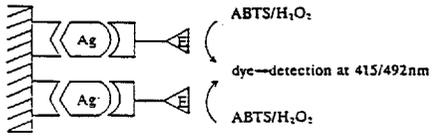
Abstract

Twin Assay of 17 α -Hydroxyprogesterone and human Thyroid Stimulating Hormone in Dried Blood by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Akio Tsuji

The twin assay of 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) and human thyroid stimulating hormone (hTSH) in dried blood spotted on filter paper was developed by using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Horseradish peroxidase (HRP) was used as label enzyme, the enzyme activity of bound fraction after B/F separation was measured by adding hydrogen peroxide (H₂O₂) and ABTS. The measurable range of 17-OHP and hTSH were 2.5 - 160 ng/ml and 0.5 - 80 μ U/ml, respectively.

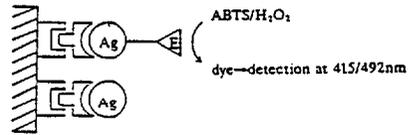
The coefficient of variation for 17-OHP and hTSH were 2.18 - 7.61% and 3.15 - 6.83%, respectively. The proposed method was applied to preliminary neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia and hypothyroidism using one (3mm) dried blood disc.



 : Antibody to hTSH (monoclonal antibody)

 : Solid phase (Surface of microtiterwell)

 : hTSH  : Horseradish peroxidase (HRP)



 : 17-OHP

 : Solid phase (Surface of TSP plate)

 : Second antibody (affinity purified anti-rabbit IgG)

 : Antibody to 17-OHP  : HRP



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と先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)の診断の指標となる 17-ヒドロキシprogesterone(17-OHP)とヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)を ELISA 法で同時に測定する方法を検討し、スクリーニングの迅速かつ省力化の可能性について検討した。