

17 α -ヒドロキシprogステロンの化学発光酵素イムノアッセイ
(分担研究：内分泌疾患等のマススクリーニング)

辻 章夫 前田昌子

要約 先天性副腎皮質過形成症の診断の指標となる17 α -ヒドロキシprogステロンの高感度なイムノアッセイ法について種々の検出法を検討した。

副腎皮質過形成症、 17 α -ヒドロキシprogステロン、イムノアッセイ

先天性副腎皮質過形成症 (CAH) ではステロイドの代謝経路のうち、21-水酸化酵素の欠損により血液中にその代謝前駆物質の17 α -ヒドロキシprogステロン (17-OHP) が蓄積するので、新生児の血液中の17-OHPを測定することによりCAHの早期発見の指標としている。

筆者らは17-OHP測定の簡便な方法としてELISA法によるマススクリーニング法を確立し、昨年1月より全出生児に対して行政レベルでスクリーニングが実施されている。

本報告では、17-OHPのより高感度な方法を開発する目的で種々の化学発光検出酵素イムノアッセイについて検討した。

酵素としては、グルコースオキダーゼ (GOD)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)、 β -D-ガラクトシダーゼ (β -GAL)、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) およびインベルターゼ (INV) を用いた。

化学発光反応としてはGODの酵素作用により生成する H_2O_2 を蛍光色素 (ANS) と過シュウ酸エステル (TCPO) G6PDHでは生成するNADPHを、 β -D-GALではガラクトースデヒドロゲナーゼ (GALDH) を共役させて生成するNADHを、またALPの場合はNADPを基質として生成するNADにアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)

を共役させてNADHとして、あるいはアダマンタン誘導体の基質AMP PDを用いて化学発光検出した。

INVは蔗糖を基質として酵素加水分解により生成するフルクトースとグルコースをアルカリ性でルシゲニンで化学発光検出した。

表1および Fig. 1 に用いた酵素の化学発光検出法を示す。

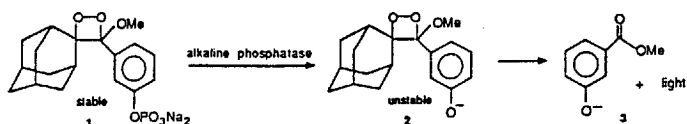
これらの方法でのそれぞれの酵素の検出限界は $10^{-16} \sim 10^{-20}$ mol であり、また17-OHPの検出限界は 148 amol \sim 3.2 fmol であった(表 2)。

検量線の例を Fig. 2 に示す。

表1 化学発光検出による酵素活性の測定法

酵 素	化学発光反応
グルコースオキシダーゼ (GOD)	$\text{グルコース} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{グルコノラクトン} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4\text{O} - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4\text{O} - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{O} + 2\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4$ $\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4\text{O} - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{O} + \text{F} \longrightarrow \text{F}^* + 2\text{CO}_2 \quad \text{F}^* \longrightarrow \text{F} + h\nu$
β -D-ガラクトシダーゼ (β -Gal)	$o\text{-ニトロフェニル}\beta\text{-D-ガラクトシド} \xrightarrow{\beta\text{-Gal}} \beta\text{-D-ガラクトース} + o\text{-ニトロフェノール}$ $\beta\text{-D-ガラクトース} \xrightarrow{\text{Gal1DH}} \text{D-ガラクト-1,5-ラクトン} + \text{NADH}$ $\text{D-ガラクト-1,5-ラクトン} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Gal1DH}} \beta\text{-D-ガラクトース} + \text{NADH}$ $\text{NADH} + \text{1-MPMSH}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{1-MPMS} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{1-MPMS} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{1-MPMSH}_2 + \text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2)$ $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2) + \text{m-POD} + \text{イソルミノール} \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + h\nu$
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)	$\text{グルコース-6-P} \xrightarrow[\text{G6PDH}]{\text{NAD}} \text{6-ホスホグルコノラクトン} + \text{NADH}$ $\text{グルコース-6-P} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{6-ホスホグルコノラクトン} + \text{NADH}$ $\text{NADH} + \text{1-MPMS} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{1-MPMSH}_2$ $\text{1-MPMSH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{1-MPMS} + \text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2)$ $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2) + \text{m-POD} + \text{イソルミノール} \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + h\nu$
アルカリホスファターゼ (ALP)	$\text{NADP} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{NAD} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \quad \text{ADH} \quad \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{OH}$ $\text{NADP} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{NAD} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ADH}} \text{CH}_3\text{OH} + \text{NADH}$ $\text{NADH} + \text{1-MPMS} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{1-MPMSH}_2$ $\text{1-MPMSH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{1-MPMS} + \text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2)$ $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2) + \text{m-POD} + \text{イソルミノール} \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + h\nu$
インベルターゼ (INV)	$\text{蔗糖} \xrightarrow{\text{INV}} \text{グルコース} + \text{フルクトース} \quad (\text{還元糖})$ $\text{蔗糖} \xrightarrow{\text{INV}} \text{グルコース} + \text{フルクトース}$ $\text{グルコース} + \text{Luminophore} \xrightarrow{\text{INV}} \text{グルコノラクトン} + \text{Luminophore}^-$ $\text{Luminophore}^- + \text{OH}^- \longrightarrow \text{Luminophore} + h\nu$

Fig. 1 Novel Chemiluminescent Enzyme Substrate



Irena Bronstein et al. : TROPIX INC.

A. Paul Schaap : Department of Chemistry,
Wayne University

Fig. 2

CHEMILUMINESCENT EIA FOR 17 α -HYDROXYPROGESTERONE USING G6PDH AS LABEL

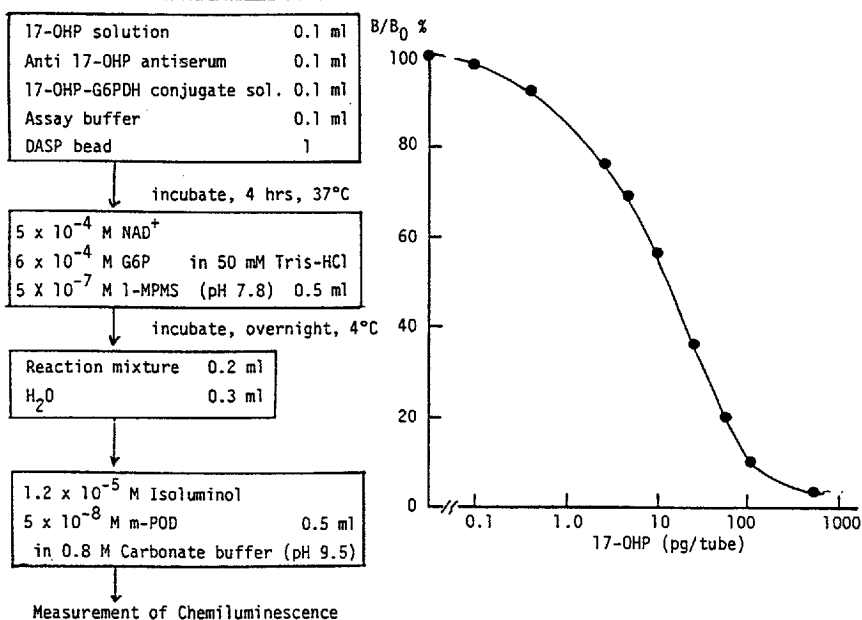


表 2

DETECTION LIMITS OF ENZYME AND 17-OHP BY VARIOUS CHEMILUMINESCENT REACTION

Enzyme	Detection limit of enzyme	Detection limit of 17-OHP
glucose oxidase	3.2 x 10 ⁻¹⁶ mol	0.5 pg(1.6 fmol)
β -D-galactosidase	1.0 x 10 ⁻²⁰ mol	0.04pg(148 amol)
glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.0 x 10 ⁻¹⁸ mol	0.1 pg(320 amol)
alkaline phosphatase		
NADP method	1.0 x 10 ⁻¹⁹ mol	0.1 pg(320 amol)
AMPPD method	1.0 x 10 ^{-19 -20} mol	0.1 pg(320 amol)
invertase	7.0 x 10 ⁻¹⁶ mol	1 0 pg(3 2 fmol)



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 先天性副腎皮質過形成症の診断の指標となる 17 β -ヒドロキシprogesteronの高感度な免疫アッセイ法について種々の検出法を検討した。