

## 神経芽細胞腫マス・スクリーニングの基礎的検討

(分担研究：現行マス・スクリーニングシステムの問題点に関する研究)

二宮恒夫<sup>1</sup> 楠本恭子<sup>2</sup>

要約：東洋濾紙No. 327で採取した乾燥尿を用いてVMAとHVAをEIA法とHPLCで定量した。No. 327の採取尿量(クレアチニン量)は、これまで使用していたNo. 2に比べて約2倍採取されており、検体量不足による再検率が低下し、溶出時、濾紙くずも少なかった。No. 327からの溶出尿のHPLCによるVMA, HVA値は、No. 2と差はなかった。EIA法の測定値とHPLCの値は相関したが、EIA法でのHVA値はときに高値を示し、酢酸エチル抽出後はHPLCの値と一致した。

見出し語：神経芽細胞腫, EIA法, HPLC, 東洋濾紙No. 327

目的：神経芽細胞腫のマス・スクリーニングにHPLCが導入され、VMAとHVAの同時定量が行われるようになり、患者の発見率が増加した。<sup>1)</sup>しかし、マス・スクリーニングの条件として、検体不備による再検がなく、操作が簡単で、費用が安価であるということを見ると、スクリーニング法の改善が必要である。今回、濾紙尿の尿量不足による再検査をなくす目的で、厚い濾紙ではあるが、透気度、濾速、溶出性などにすぐれている東洋濾紙No. 327を用いて採尿し、東洋濾紙No. 2と比較する。また、VMAとHVAの測定を簡便なenzyme immunoassay (EIA)法にて行い、HPLCによる測定結果と比較検討する。

方法：東洋濾紙No. 2とNo. 327 (1 cm × 5 cm 大)に同時に尿を採取させ、日陰にて空気乾燥後、郵送させる。採尿は、①脱脂綿を外陰

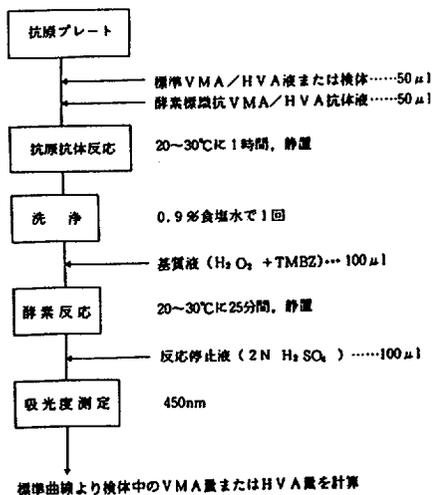
部にあて尿を含ませ、濾紙に滴下させるか、②脱脂綿の間に濾紙をはさみ外陰部に直接あてる2つの方法で行われた。

乾燥濾紙尿は、ハサミで約10片に切り、1/6 M.PBS, pH 7.4を1 ml 加えて放置し尿を溶出させる。この溶液を用いて、VMA, HVAをEIA法にて、クレアチニンをFolin-Wu法(jaffe 反応)にて処理後、吸光度をマイクロプレートリーダー(東ソーMPR, A 4)で測定し(VMA, HVAは450 nm, クレアチニンは520 nm)、標準曲線より値を求め、VMA, HVAはmg・creatinineに換算した。

EIA法の原理は、固相化抗原(VMAあるいはHVA)と尿中の抗原を一定量の酵素標識モノクローナル抗体に対して競合させ、洗浄後固相化抗原に結合した抗体量を測定する<sup>2)3)</sup>もので、実際の測定はキット(ヤマサ

醤油)を用い、手順は図1に示した。

図1 EIA法



HPLC 測定用の試料は、酒石酸で溶出し、クレアチンの測定もこの溶出液を用い、HPLC 測定値の換算に用いた。なお、VMA, HVA の検出には、電気検出器 (クーロメトリック) を用いた。

結果：東洋濾紙No.327での採尿は、No.2に比べて約2倍の尿量 (クレアチニン量) がえられ、クレアチニンが低いために再検される検体が少なかった。また、溶出時にNo.327の濾紙くずは少なかったが、脱脂綿ではさんで採尿する方法は (約40%の家族がこの方法で採取された)、綿くずが濾紙に付着し、HPLCによる測定の際は障害になった。

EIA法とHPLCによるVMA, HVAの測定値の関係を図2に示した。クレアチニンが $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、 $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の例は除外した。上段はNo.2を、下段はNo.327を用いた値の関係を示し、No.327で測定したとき、No.2でVMAを測定したときは、1%の危険率で相関がみられた。EIA法でNo.2を用いてHVAを測定したとき、検体の約10%に、HPLCでは正常であったが、非常に高

値を示す例があった (図2)。

なお、このようにHVAが高値を示す例において採尿方法にかたよりはなかった。実際の値 (mean  $\pm$  SD) を表1に示したが、HPLCによる測定においては、濾紙の差による変動は、ほとんど認められなかった。

表1 測定法、濾紙の異いによるVMA, HVA値 (mean  $\pm$  SDを示し、単位は $\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{creat}$ , 検体数は約100)

	EIA		HPLC	
	VMA	HVA	VMA	HVA
No.2	23.69 $\pm 7.88$	38.24 $\pm 50.76$	14.20 $\pm 6.30$	19.80 $\pm 5.48$
No.327	26.24 $\pm 8.34$	28.66 $\pm 10.13$	13.33 $\pm 4.94$	20.20 $\pm 4.89$

表2は、EIA法でHVAが高値を示した (Jan. 24測定分) 1例で過去2回 (Dec. 27とJan. 6)測定されていた値を示す。ex. はJan. 24 検体の酢酸エチルで抽出後の値を示し、これは正常であった。このときのクロマトグラムを図3に示したが、HVAあたりのパターンに異常を認めなかった。

考察：東洋濾紙No.327のすぐれた性質についてはすでに報告されており、<sup>4)</sup>我々もこの濾紙を用いて採尿を行ったが、No.2に比べて約2倍の量が採取され、尿量不足による再検数は著しく少くなると考えられる。しかし、濾紙を脱脂綿にはさむ採尿方法は、綿くずが濾紙に付着し、HPLCによる測定の際は障害になるため、濾紙に尿を滴下するか、濾紙を大きくして直接外陰部にあてるなどの工夫が必要と思われる。

EIA法は、モノクローナル抗体を利用し

図2：EIA法とHPLCによるVMA，HVA測定値の関係

(上段は東洋濾紙No.2を，下段はNo.327を用いたときを示し，右上図以外は1%の危険率で相関がみられた。)

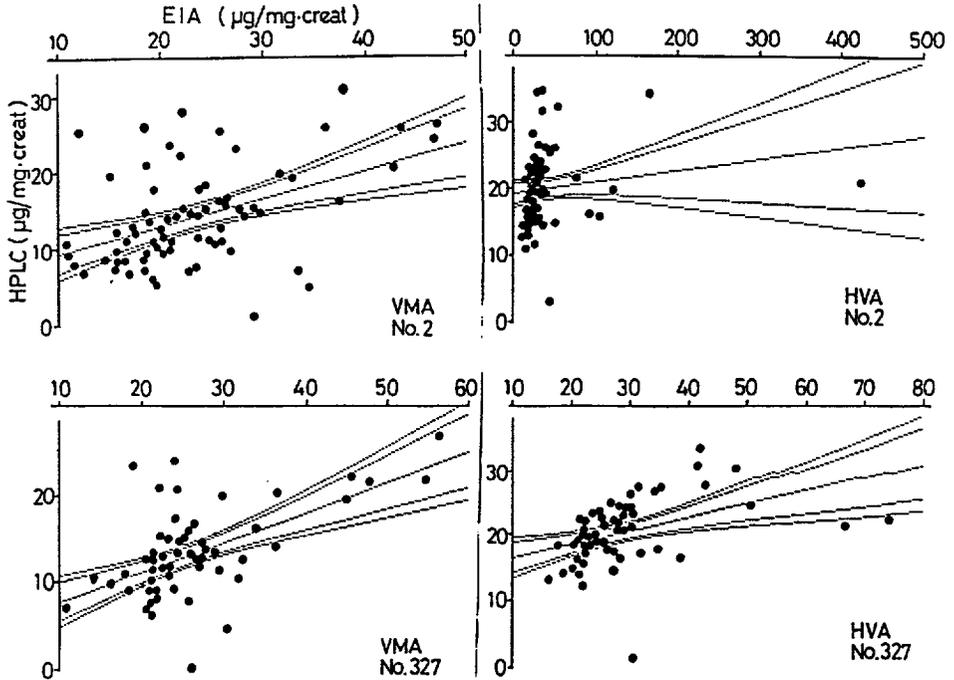
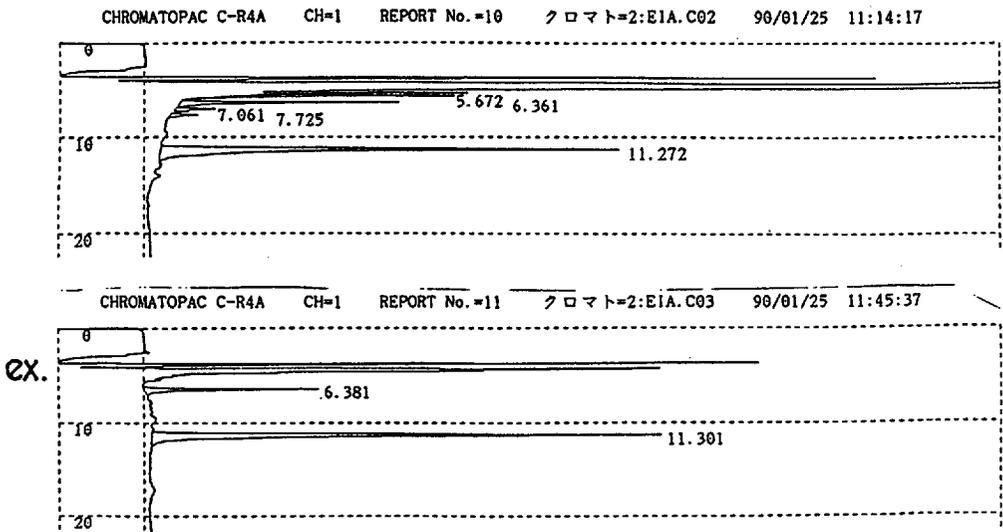


図3：表2のJan. 24のクロマトグラム。(HVA付近の異常パターンは認められない。)



文 献

た新しいVMA, HVA測定法であり, 特徴は, 操作が簡単であり, 一度に大量の検体(1つのプレートで80検体の処理が可能)を約2~3時間で測定できる点である。すでに直接希釈尿についてHPLCの値との相関が報告されており, HPLCの値より約1.6倍の値を示している。<sup>2)</sup>

しかし, EIAによるHVAの測定では, ときに高値を示した。これは, 酢酸エチルによる描出操作によって除かれること, 同一例においていつも認められる現象ではないことは今回の検討によって確認されたが, 今後さらに検討しなければならない。

EIA法は, 一度に大量の検体処理が可能であることを考えると, 現行の6カ月時スクリーニングに加えて, 年長になってもう1回行うことによって, 6カ月時陰性例で, 後に神経芽細胞腫の発生を見る症例の早期診断を行える可能性を有するスクリーニング法と思われる。

表2 EIA法にてHVAが高値を示した例のこれまでの測定値( $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{creat.}$ )を示す(ex.; 酢酸エチルによる描出後の値を示す)

	EIA				HPLC			
	VMA No.2 No.327		HVA No.2 No.327		VMA No.2 No.327		HVA No.2 No.327	
Dec.27	38.6	21.6	285	274	Low	Low	45	Low
Jan. 6	29.1	262	450	305	12	04	32	15
Jan.24	25.0	194	2323	3111	156	135	30.9	294
ex.	21.9	28.7	315	160	139	68	34.7	109

- 1) 沢田淳, 穴沢昭, 児玉京子, 他: HPLCによる神経芽腫マス・スクリーニング。日本医事新報, 3350:29-31, 1988.
- 2) Yokomori, K., Hori, T., Tsuchida, Y., et al.: A new urinary mass screening system for neuroblastoma in infancy by use of monoclonal antibodies against VMA and HVA. J. Ped. Surg., 24:391-394, 1989.
- 3) Yoshioka, M., Aso, C., Tmura, Z., et al.: Preparation of monoclonal antibodies to vanillylmandelic acid and homovanillic acid. Biogenic Amines, 4:229-235, 1987.
- 4) 柳沼章弘, 成瀬浩, 松田博雄, 他: 神経芽細胞腫スクリーニングのための新しい採尿濾紙とELISA法の導入 第17回代謝異常スクリーニング研究会抄録集, P 16, 1989.

1 ; 徳島大学医療技術短期大学部, 2 ; 徳島大学医学部小児科



## 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:東洋濾紙 NO.327 で採取した乾燥尿を用いて VMA と HVA を EIA 法と HPLC で定量した。NO.327 の採取尿量(クレアチニン量)は、これまで使用していた NO.2 に比べて約 2 倍採取されており、検体量不足による再検率が低下し、溶出時、濾紙くずも少なかった。No.327 からの溶出尿の HPLC による VMA,HVA 値は,No2 と差はなかった。EIA 法の測定値と HPLC の値は相関したが,EIA 法での HVA 値はときに高値を示し、酢酸エチル抽出後は HPLC の値と一致した。