

神経芽細胞腫スクリーニング技術改善の研究

－ELISA法採用の可否についての多施設検討－

(分担研究：現行のマススクリーニングシステムの問題点に関する研究)

成瀬 浩<sup>1)</sup>、渡辺倫子<sup>1)</sup>、五十嵐優子<sup>1)</sup>、沢田 淳<sup>2)</sup>、二宮恒夫<sup>3)</sup>、花井潤師<sup>4)</sup>、  
福士 勝<sup>4)</sup>、松本 勝<sup>5)</sup>、穴沢 昭<sup>5)</sup>、惟村直仁<sup>6)</sup>、武井節子<sup>7)</sup>、松本 進<sup>7)</sup>、  
梅橋豊蔵<sup>8)</sup>、好井信子<sup>9)</sup>、楠本恭子<sup>10)</sup>、小田辺なお子<sup>11)</sup>

要約 神経芽細胞腫スクリーニングは、HVA、VMA定量法の導入により、その精度は一段と向上したが、同時にHPLC法を必要とするようになったため、諸種の問題が発生した。昨年度は、この問題の解決のため、適切な採尿濾紙を決定した。今年度は、この濾紙を用いて採尿し、10施設において濾紙尿中のHVA、VMAを測定し、さらにその中の9施設では、HPLCとELISAの相関を求めた。その結果VMAに関しては、十分にELISAが使用可能であることがわかった。HVAについても、大多数はHPLCとELISAの値はよい相関を示すが、約1～数%の検体で、HPLCは正常でELISA陽性となることがわかった。この主な原因は、尿が濾紙上で軽度に変性をおこした時に、いくつかの物質が現れ、それがHPLCでは発見出来ないが、ELISAでは抗体と反応するためと考えられる。このような変性を皆無にすることは極めて困難と考えられる。そのため、第一次スクリーニングで、HVA陽性に出たものを、有機溶媒で抽出し、更にELISAで測定するという、抽出法を採用すれば、ELISAの値が、HPLCの値とよい相関を示すことがわかった。以上から、ELISA法が、第一次スクリーニングとして、HPLC法に替わって使用しうるものとする。

見出し語：神経芽細胞腫スクリーニング、ELISA (VMA、HVA)

|           |                   |                      |
|-----------|-------------------|----------------------|
| 目的        | 神経芽細胞腫スクリーニングの技術的 | 検討し、新しい濾紙が良いことを報告した。 |
| 改善の研究として、 | 昨年は採血濾紙の問題を       | 今回は、HPLC法に替わり、ELISA法 |

- 1) 杏林大学小児科 2) 京都府立医科大学小児科 3) 徳島大学医療技術短大  
4) 札幌市衛生研究所 5) 東京都予防医学協会 6) 聖マリアンナ医科大学  
7) 大阪市環境衛生検査所 8) 熊本化学及血清療法研究所 9) 香川県衛生研究所  
10) 徳島大学小児科 11) 新潟県保健衛生センター

がスクリーニング法として有効か否かの検討を行うこととした。HPLC法はすぐれた方法であるが、操作技術は決して容易でなく、また、設備などのコスト的問題も考慮しなければならない。このため、第一次スクリーニングとしてはより簡便で、しかも特別な機器を必要としない方法の開発が必要とされる。

我々は、このスクリーニングのため、ELISA法が使用可能か否かの検討を行うこととした。

**方法と結果** 昨年の研究により、濾紙は東洋濾紙No. 327を使用した。ELISA測定試薬としては、ヤマサ醤油株式会社製のVMA、HVA測定キットを用いた。HPLC法に関しては、各施設において通常のスクリーニングに用いる方法をそのまま採用することとした。各施設の測定結果を集め、集計処理を行った。

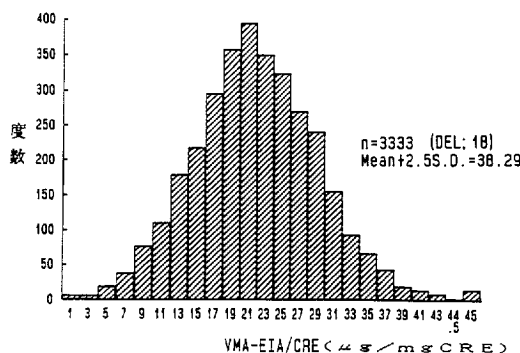
各施設で、上記の濾紙を6カ月乳児で研究協力を依頼しうる範囲に配布し、郵送で回収し、燐酸緩衝液(pH7.4)で尿中の物質を抽出して、それをHPLC測定用とELISA測定用に分け定量した。一施設では、HPLCが実施不可能であった。なお、この際、クレアチニンを測定し、著しく希釈された尿あるいは変性がつよい尿は除くため、クレアチニン値5~8mg/dl以下のものは不適当検体とした。HVAの偽陽性検体については、更に上記の抽出液700 $\mu$ lに、2.6%HC1300 $\mu$ l、酢酸エチル300 $\mu$ l、NaCl飽和と10分混和後遠沈し、酢酸エチル層約1.5mlをとり、蒸発乾固させ、燐酸緩衝液280 $\mu$ lで溶解させ、これをHPLC、ELISA測定に供した。

**結果** 図1、2に、それぞれ上記10施設で得られた正常時の尿中VMA、HVAの分布を示した。VMAは3351検体を測定し、18検体(0.54%)は、異常に高値などで除くと、あとの3333検体は、正規分布を示し、平均の+2.5SDは38.29 $\mu$ g/mg creatinineであった。HVAでは、60検体(1.8%)が異常に高くなっており、これを除くと平均の+2.5SDは30.48 $\mu$ g/mg creatinineとなった。分布図は正規分布に近く、+2.5SDの値も佐藤らのHPLC測定値の報告<sup>1)</sup>(VMA=25 $\mu$ g/mg creatinine、HVA=32 $\mu$ g/mg creatinine)とほぼ同様である。

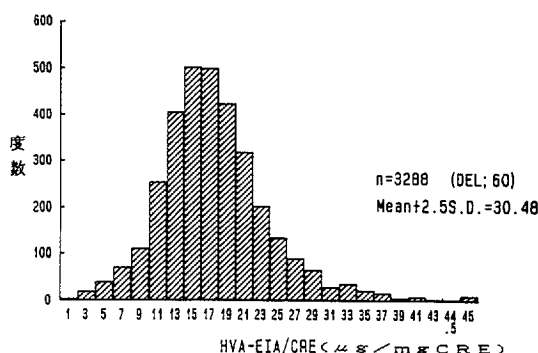
(なおVMAに関してはHPLCの場合、スタンダード中のd・l体共に測定しているが、ELISAの場合、自然存在のd-VMAのみを基質とするので、同一スタンダードを用いた場合には約2倍の値になる訳である。)

VMAの場合、上記のうち、9施設でHPLCとの相関をみているが、ほぼよい相関である。しかしHVAの場合は、HPLC正常でELISAで高いものがあるため、よい相関とは言えない。概して言えば、HVAでは、2~3%のものがELISAで高くなっているようである。

これらの検体を詳しくみると、HPLCで普通尿にみられない多くのピークが見られ、これは正常尿を変性腐敗などさせた時の現象に近いと考えられる。幸いこれらの物質は水溶性で、有機溶媒で抽出されにくく、一方HVAは溶媒抽出が可能である。そこで上記の各施設で、HVAがELISAのみで高く出た38検体と、我々の所で尿を放置して変性させ、ELISAのみでHVAが高くなった8検体、更に現在国外で同一キットを使用している所のうち、ロスアンジェルスとデンマ



第1図 ELISA法による健康乳児中のVMA値の分布図

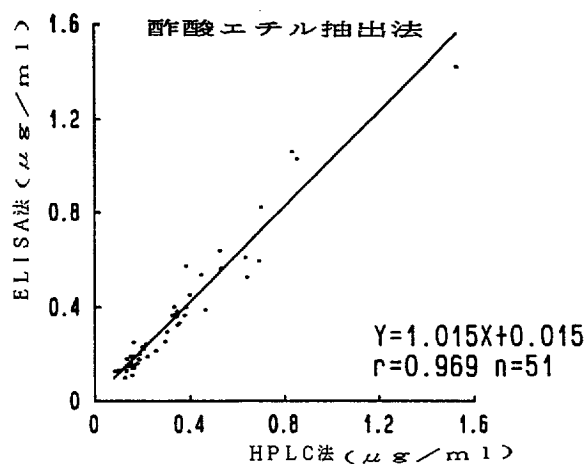


第2図 ELISA法による健康乳児中のHVA値の分布図

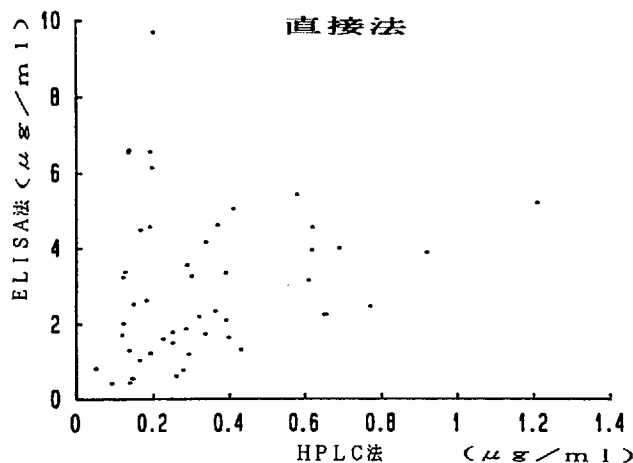
ークのスクリーニング施設で、やはりELISAのみで、HVAが高く出た5検体を加え、全部で51検体について、酢酸エチル抽出を行い、抽出法について、ELISAとHPLCの値についてを比べてみた。第3図にみる様に、抽出法で測定したものはよい相関を示している。第4図に抽出法を行う以前の値、つまり直接法によるこれらの値の相関を示した。全く相関のなかったこれらの検体も抽出法により、ELISA、HPLCの両者の値により相関がみられる様になったわけである。

考察 東洋濾紙No. 327を用い、10施設で生後6ヶ月の一般乳児の尿3500検体を集め分析を行った。その分布は、ほぼ正規分布を

示した。そして平均+2.5SDの値をとると、ほぼHPLC値と同様のカットオフ値であった。ただ、HVAの場合、ELISAで高値で、HPLCは正常という検体があり、これらは、一つには尿の変性により新しく生産された物質によるらしい事がわかった。そこで、これらの物質を除くため酢酸エチル抽出法を行った所、HPLCの値とELISAの値がほぼ同様となった。つまり、ELISAで抗体に反応する物質のほとんどが、溶媒抽出により除去出来ることがわかって来た。実際のスクリーニングでは、17OHP測定の時と同様に、まず直接法で測定し、HVA一定の値以上のものを、酢酸エチルなど有機溶媒での抽出法で、再測定することが必要であろう。こ



第3図 抽出法によるHPLC法とELISA法のHVA値相関図



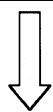
第4図 直接法によるHPLC法とELISA法のHVA値相関図

の様な操作で尚VMA、HVAの高いものは、更にHPLCで測定することにより、より確実な値が得られるであろう。あるいは、神経芽細胞腫スクリーニングで、軽度のHVA、VMA増加のもの、正常か否かの判断を下す事は、決して急ぐことはないので、精度管理システムで、中央精査ラボをつくり、ここで詳しく分析するという流れを作ってもよいであろう。いずれにせよ、今回の検討により、No. 327の濾紙を用いて、HVA、VMAのELISA法を用いるスクリーニングは、

HPLCと比較しうる様な定量的結果を得ることが出来ることを示した。現在の定量的マススクリーニング（第一次スクリーニング）の手段として、ELISAを用うることがより实际的であろう。

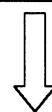
#### 文献

- 1) 高杉信男、佐藤泰昌：スクリーニングの技術7)神経芽細胞腫、成瀬 浩、松田一郎編 新生児マススクリーニングハンドブック、p300-309、南江堂(1989)



## 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 神経芽細胞腫スクリーニングは、HVA,VMA 定量法の導入により、その精度は一段と向上したが、同時に HPLC 法を必要とするようになったため、諸種の問題が発生した。昨年度は、この問題の解決のため、適切な採尿濾紙を決定した。今年度は、この濾紙を用いて採尿し、10 施設において濾紙尿中の HVA,VMA を測定し、さらにその中の 9 施設では、HPLC と ELISA の相関を求めた。その結果 VMA に関しては、十分に ELISA が使用可能であることがわかった。HVA についても、大多数は HPLC と ELISA の値はよい相関を示すが、約 1～数% の検体で、HPLC は正常で ELISA 陽性となることがわかった。この主な原因は、尿が濾紙上で軽度に変性をおこした時に、いくつかの物質が現れ、それが HPLC では発見出来ないが、ELISA では抗体と反応するためと考えられる。このような変性を皆無にすることは極めて困難と考えられる。そのため、第一次スクリーニングで、HVA 陽性に出たものを、有機溶媒で抽出し、更に ELISA で測定するという、抽出法を採用すれば、ELISA の値が、HPLC の値とよい相関を示すことがわかった。以上から、ELISA 法が、第一次スクリーニングとして、HPLC 法に替わって使用しうるものとする。