

尿中pregnanetriol-3-glucuronide濃度のELISA法による測定とその応用
(分担研究：現行マススクリーニング対象疾患の精査上の問題点に関する研究)

下澤和彦¹、豊浦多喜雄¹、関野高弘¹、税所純敬¹、松本 勝²、神戸川 明³

〔要約〕先天性副腎過形成症(21-水酸化酵素欠損症)の診断ならびに治療上の検査指標として重要な尿中pregnanetriol (PT)濃度の測定は、従来から(毛細管)ガスクロマトグラフィーにより測定されてきた。今回はより高感度でかつ簡便なPT-3-glucuronide (PT-3-G)のELISA法による測定法を新たに開発し、その臨床応用について検討した。本法によるPT-3-Gの測定感度は、測定に供する尿量が少量であるにもかかわらずきわめて高感度であり、尿汚紙からの測定も可能なレベルであった。測定の特異性も満足できるものであり、かつ毛細管ガスクロマトグラフィー法との相関も良好であった。本法はマススクリーニングや治療コントロールの評価(ことに過剰治療の決定)に応用ができるため、本症の診断のみならず成長予後の改善へも有用であろう。

〔見出し語〕pregnanetriol-3-glucuronide、ELISA

〔研究目的〕

21-水酸化酵素欠損症(21-OHD)の確定診断には、 17α -OH-progesterone (17-OHP)や21-deoxycortisolの血中濃度のほか、これらの主要な尿中代謝産物であるpregnanetriol (PT)やpregnanetriolone (PTL)濃度の測定が有用である。これら尿中ステロイド代謝産

物の測定は、これまでは毛細管ガスクロマトグラフィー(GC)によること多かったが、必要検体量が多くかつ測定が煩雑であった。今回我々は、PTのほとんどがPT-3-glucuronide (PT-3-G)の形で尿中に排泄されるところから、PT-3-GのELISA法を開発しその臨床応用について検討した。

¹:東京医科歯科大学医学部小児科(Dept. of Pediatr., Fac. of Med., Tokyo Med. & Dent. Univ.)、²:東京都予防医学協会(Tokyo Health Service Association)、

³:帝京大学医学部産婦人科(Dept. of Obst. & Gyn., Sch. of Med., Teikyo Univ.)

[研究方法]

抗PT-3-G血清とHRP標識PT-3-G

図1のように、第1抗体にはPT-3-Gのglucuronideの6位にBSAを結合させたものを家兎に免疫して得られたポリクローナル抗体を用いた。HRPの標識も同様の部位に行なった。

抗PT-3-G抗体の特異性

抗PT-3-G抗体と各種尿中ステロイドとの交叉反応性を表1に示した。FreeのPTとPTLに対しては各々15.0と3.9%であり、PTL-3-Gに対しては7.6%であった。PTとPTLの硫酸抱合体に対しては各々0.22と0.05%であり、さらに尿中に比較的多量に存在するTHE、THFやandrosteroneなどのステロイドとの交叉反応性もきわめて低く、本抗体の特異性は高いものと考えられた。

測定法

測定法の概要を図2に示した。第2抗体固相化プレートに、0~30 ng/mlの標準液あるいは検体希釈尿、HRP標識PT-3-G液、抗PT-3-G-BSA血清の各々50 μ lを加え2時間incubateし、洗浄後発色液150 μ lを加えさらに30分間放置後、反応停止液を加え490 nmでの吸光度を計測した。

[研究結果]

標準曲線

図3に標準曲線の1例を示した。PT-3-Gの0~30 ng/mlで良好な曲線が得られた。感度は0.3 ng/ml (15 pg/well)と きわめて高感度であったため、通常の検体では尿を20倍希釈し、高濃度の検体では希釈度をさらに上げて測定した。

希釈試験

PT-3-Gが約30 ng/mlと60 ng/mlの検体尿で希釈試験を行なった。図4に示したように両者とも原点を通る直線性が得られた。

精度ならびに正確度

PT-3-Gが約3~30 ng/mlの検体での測定内変動は6.8~8.2%、測定間変動は7.1~11.1%でともに満足できるものであった。またPT-3-Gが82.9 ng/lすなわち82,900 ng/mlと10,000倍希釈を要した異常高値の検体での測定内変動は11.7%であった。

尿中クレアチニンとの相関

正常成人ならびに小児の尿検体を用いて、尿中PT-3-G濃度とクレアチニンとの相関を検討したところ、両者の間には正の相関関係が得られた。このことは1回尿中PT-3-G濃度はクレアチニン比で現わすことが妥当であることを示している。

毛細管GC法との相関

本法と毛細管GC法との相関をPT換算値で図5に示した。対象は主に治療開始前ならびに治療中の21-OHDである。検討した43検体では、本法(Y)とGC法(X)とではほぼ等しい測定値であり、 $Y=0.96X+0.009$ の良好な相関関係が得られた。

[考察]

21-OHDの確定診断には尿中のPTやPTLなどの異常増加の証明が重要である。従来から尿中ステロイドの測定には比色法やGC法が用いられているが、前者はその特異性に難があり、後者は測定

に先だつて前処理が必要であったり、分析に時間を要したりとその操作性に難があった。そこで今回は、多数の検体をきわめて簡便にかつ迅速に測定することが可能なELISA法による尿中PT-3-G濃度の測定法を新たに開発した。PT-3-Gを測定する意義は、PTは生体では遊離型のままで排泄されることが少なくそのほとんどがglucuronideとして排泄されるためである。本法は前処理なく希釈尿で直接PT-3-Gを測定するものであり、測定時間も約3時間と短くかつ測定感度と特異性に優れており、PTのみの測定としては実際的と考えられた。

ところで、21-OHDといえども、早期新生児期ではPTあるいはPTLの排泄は多くないとされている。しかしながら、本法は低濃度域のPT-3-Gの定量に優れており、この時期でのPT-3-Gの正常値を求めることにより、21-OHD患児の同定にも応用できる可能性がある。ことにマススクリーニングで陽性とされた未熟児の診断には、本法が 16α -ヒドロキシステロイドやC19ステロイドの影響を受け難いところから、有用かもしれない。今後明らかにする予定である。

本法の測定感度は15 pg/wellで、通常の20倍希釈尿では6 ng/ml (0.006 mg/l)である。これまでのGC法では、多くのコントロール良好の21-OHD患児も過剰治療の患児もともに感度以下となり、検

査による鑑別は不可能あるいは困難であったが、本法によって尿中PTの正常排泄量が定められれば、過剰治療の把握が容易となる。21-OHDの治療の困難さは、検査上の良好なコントロールは必ずしも適切な治療を示すものでなく、時として過剰治療による肥満あるいは成長障害を招くところにある。本法はこの意味で、患児のコントロール状態の把握ひいては成長予後の改善をも可能にすると考えられる。

高感度測定は滲紙尿によるPT-3-Gの測定も可能とした。仮に直径3mmの滲紙尿ディスクを測定に用いた場合は、含有尿量は約 $2.5\mu\text{l}$ であるからその測定感度は6 ng/mlである。採尿の困難な乳児で、神経芽細胞腫の際と同様な採尿を自宅で分画して行なえば、尿中PT濃度の日内変動を容易に検査でき、治療コントロールの正確な把握も可能となるであろう。来年度の研究課題の1つにする予定である。

また、今回は尿中PT-3-Gの測定法とその応用法について検討したが、21-OHDのより特異的な検査学的指標は尿中PTL濃度であるとされていることから、今後は同様の手法を用いてPTL-3-GのELISA法を開発し、マススクリーニングや治療への応用法について検討していきたい。

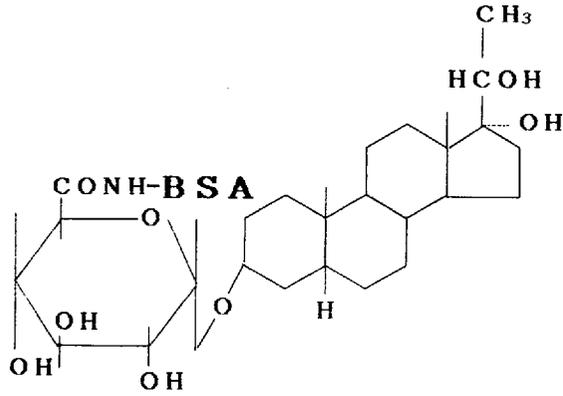


図1. PT-3-G-BSAの構造

表1. 抗PT-3-G-BSA血清の特異性

PT-3-G	100	%
PT	15	
PTL-3-G	7.6	
PTL	3.9	
Pregnanediol-3-G	2.7	
11-deoxy- α -cortol	0.60	
PT-3-S	0.22	
Pregnanediol	0.17	
α -cortol	0.13	
THS	0.07	
PTL-3-S	0.05	
17-OHP	0.03	

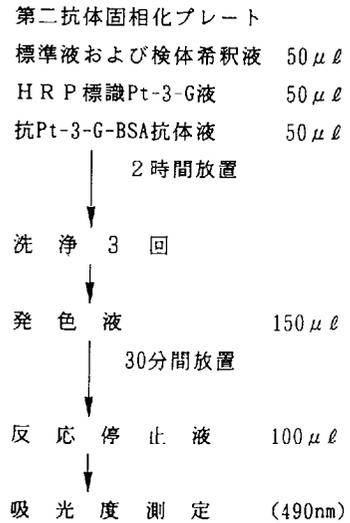


図2. 測定法の概要

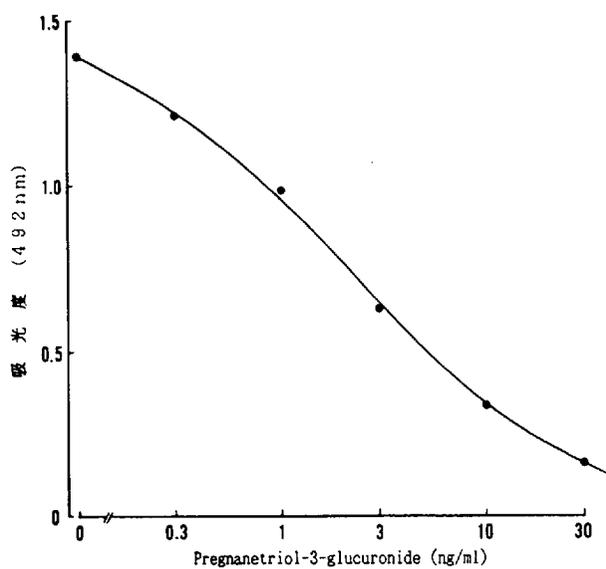


図3. PT-3-G ELISA法の標準曲線

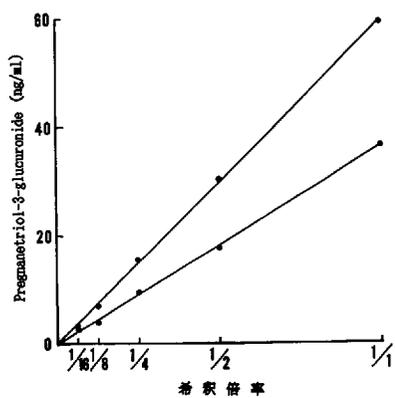


図4. 希釈試験

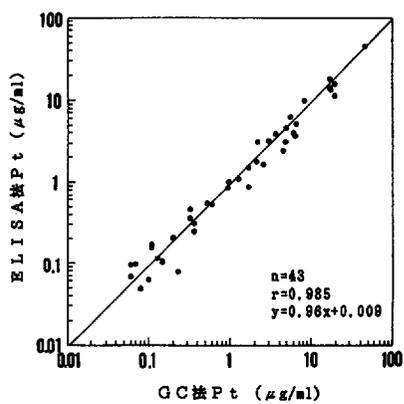
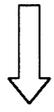


図5. 毛細管GC法との相関



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(21-水酸化酵素欠損症)の診断ならびに治療上の検査指標として重要な尿中 pregnanetriol(PT)濃度の測定は、従来から(毛細管)ガスクロマトグラフィーにより測定されてきた。今回はより高感度でかつ簡便な PT-3-glucuronide(PT-3-G)の ELISA 法による測定法を新たに開発し、その臨床応用について検討した。本法による PT-3-G の測定感度は、測定に供する尿量が少量であるにもかかわらずきわめて高感度であり、尿炉紙からの測定も可能なレベルであった。測定の特異性も満足できるものであり、かつ毛細管ガスクロマトグラフィー法との相関も良好であった。本法はマススクリーニングや治療コントロールの評価(ことに過剰治療の決定)に応用ができるため、本症の診断のみならず成長予後の改善へも有用であろう。