

神経芽細胞腫スクリーニング技術改善の研究(Ⅱ)

— ELISA法とHPLC法の比較検討 —

(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)

梅橋豊蔵¹⁾、田崎隆二¹⁾、花井潤師²⁾、福士 勝²⁾、沢田 淳³⁾、成瀬 浩⁴⁾、渡辺倫子⁴⁾

要約 現在日本の神経芽細胞腫スクリーニングはHPLC法が推進されているが、マス・スクリーニングの方法としては、いくつかの短所を含み、必ずしも全ての施設にとって適切な方法ではない。そこで、第一次マス・スクリーニングのためのものとしてはELISA法の使用が考えられる。我々は、化血研、札幌市衛研でHPLC法でスクリーニングを行った検体を、すぐに結果を知らせることなく送付し、全くブラインドでELISA法を実施し、この二つの異なる方法による結果を対比させ、ELISA法の妥当性を分析した。

ELISA法としては、ヤマサ醤油(株)のVMA・HVA測定キットを用いた。40,780検体分析の結果、一応よい相関がみられ、この間9例の患者があったが、ELISA法でも全員発見されていた。この方法も現実のスクリーニング方法として採用可能であろう。

見出し語：神経芽細胞腫スクリーニング、ELISA(VMA、HVA)

(目的) わが国の神経芽細胞腫マス・スクリーニングは、現在、検査法に関してはHPLC法が推奨されている。この一次検査法をHPLC法で実施するについては、機器トラブルやメンテナンス等の問題もあり、必ずしも全ての施設にとって適切な方法ではないのではないかと考える。

一方では、ヤマサ醤油(株)等により開発されたELISA法による研究も進められており、その基礎的な検討結果を含め、大方の意

見では、ほぼスクリーニングレベルに到達しているものとする。今回我々はこの測定系の検討を更に一步進めて、実際のマス・スクリーニングのレベルで検討を行ったので報告する。

(方法) 今回の検討は、札幌市衛研と化血研のスクリーニング検査済濾紙尿により、ブラインドの状態でのELISA法の測定を行い、この結果と札幌市衛研と化血研のHPLC法で

1) 化学及血清療法研究所、2) 札幌市衛生研究所、3) 京都府立医科大学小児科、
4) 杏林大学小児科

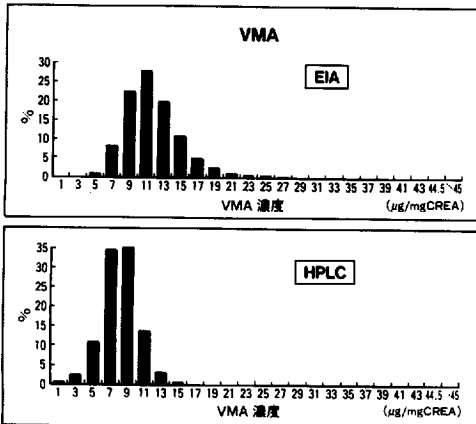
ーターを比較する形をとった。実施検体数は平成3年8月1日から平成4年1月31日までの期間に、40,780検体を測定した。

測定条件は、採尿濾紙として東洋濾紙NO.327を使用し、ELISA法は標準操作法により測定、HPLC法は2施設とも電気化学検出器による直接測定法、クレアチニン測定はアルカリ・ピクリン酸法である。

また、集計に際しては、クレアチニン 8 mg/dl以下のデータは除外してある。

(結果) 図1は、患者検体、低クレアチニン検体を除いたものについてELISA法、HPLC法で測定し、VMA測定値分布を示したものであるが、両者ともほぼ正規分布に近いヒストグラムとなっている。

ELISA法が、mean 11.96 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、カットオフとして設定した +2.5 SDが 20.96 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、HPLC法mean 8.45 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、カットオフが14.23 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ とHPLC



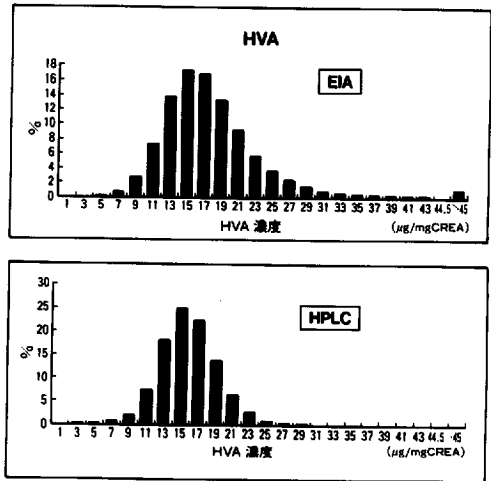
	mean	S.D.	cut-off
EIA	11.96	3.60	20.96
HPLC	8.45	2.31	14.23

n=40,777 CUT OFF=mean+2.5S.D.

図1 VMA値の分布図

法に比べELISA法がやや高値として測定されている。

図2は、HVA測定値分布である。HPLC法は正規分布であるが、ELISA法は対数正規分布となっている。ELISA法がmean 17.55 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、カットオフは32.75 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、HPLC法が mean 16.27 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ 、カットオフが 26.45 $\mu\text{g}/\text{mgCREA}$ となった。



	mean	S.D.	cut-off
EIA	17.55	6.08	32.75
HPLC	16.27	4.07	26.45

n=40,777 CUT-OFF=mean+2.5S.D.

図2 HVA値の分布図

一定期間2000例によるELISA法とHPLC法の相関図を図3に示した。

VMAが相関係数 $r=0.945$ 、回帰式 $y=0.82x-0.01$ と良好となった。HVAでは相関係数 $r=0.781$ 、回帰式 $y=0.78x-0.01$ とまずまずの相関関係が得られが、図に示すように、HPLC法に比べELISA法で高値として測定される検体が存在する。

患者検体を除いた40,780検体のELISA、HPLC両測定値を、平均値+標準偏差によ

り分類して比較したものを表1に示す。VMAにおいては、両方のデータが一致したものが97.4%、ELISA法がカットオフ以下でHPLC法がカットオフ以上が0.23%、HPLC法が以下でELISA法が以上のものが2.08%となっており、良好な一致率となっている。一方、HVAは一致率95.71%で、ELISA法がカットオフ以下でHPLC法がカットオフ以上が0.3%、HPLC法が以下でELISA法が以上のものが3.5%となった。VMA、HVAともHPLC法に比較してELISA法が高値となる検体が一部見られる。

表1 HPLCとEIAの測定値の比較

～患者を除いた新生児測定における測定法の平均値±標準偏差(S.D.)による比較分類～

<VMA>		H P L C			
		2.5 S.D.以下	2.5~3 S.D.	3~4.5 S.D.	4.5 S.D.以上
B	2.5 S.D.以下	39718 (97.40%)	51 (0.13%)	38 (0.09%)	3 (0.01%)
	2.5~3 S.D.	428 (1.03%)	13 (0.03%)	9 (0.02%)	2 (0.01%)
	3~4.5 S.D.	347 (0.86%)	27 (0.07%)	38 (0.09%)	6 (0.01%)
A	4.5 S.D.以上	72 (0.18%)	2 (0.01%)	5 (0.01%)	21 (0.05%)

(平均値± S.D.) n=40780

<HVA>		H P L C			
		2.5 S.D.以下	2.5~3 S.D.	3~4.5 S.D.	4.5 S.D.以上
B	2.5 S.D.以下	39031 (95.71%)	79 (0.19%)	36 (0.09%)	9 (0.02%)
	2.5~3 S.D.	343 (0.84%)	16 (0.04%)	14 (0.03%)	3 (0.01%)
	3~4.5 S.D.	457 (1.12%)	18 (0.04%)	37 (0.09%)	18 (0.04%)
A	4.5 S.D.以上	628 (1.54%)	16 (0.04%)	17 (0.04%)	67 (0.16%)

(平均値± S.D.) n=40780

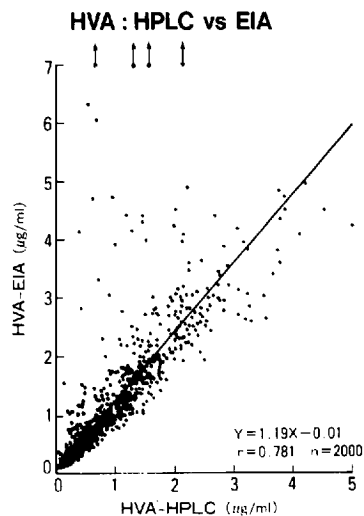
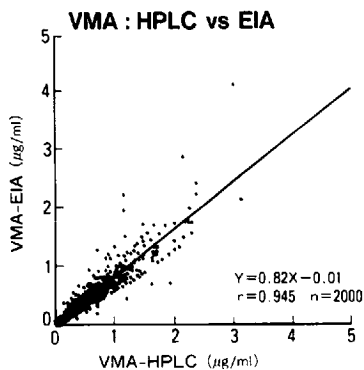


表2はVMAについてELISA法で平均値+2SD以下で測定された検体が、HPLC法で3.5SD以上を示したものについてその値を比較したものである。実際には数検体を除いて、その値は近似している。

表2 VMA

～HPLCで平均値+3.5 S.D.以上、
EIAで平均値+2 S.D.以下の検体例～

HPLC	ID-No	EIA 2 S.D.以下	
		EIA (µg/mgCREA)	HPLC (µg/mgCREA)
3.5~4 S.D.	42	16.94	16.00
	60	17.15	16.60
	72	14.45	16.10
	141	14.71	16.10
	158	17.54	16.50
	230	18.97	16.70
	246	16.37	16.90
	S-5759	17.95	16.20
S-10903	13.67	16.70	
4~4.5 S.D.	44	18.46	17.40
	160	16.70	17.70
	171	11.62	17.70
4.5 S.D.以上	8	18.36	26.80
	S-1233	18.90	18.50
	S-7570	16.31	19.00

図3 EIA法とHPLC法の相関図

この研究を行っている間に、9例の患児が発見されたが、VMAについてはELISA、

HPLC両方法とも発見出来ており、発症頻度として1/4531である。両者間のカットオフ値とのバランス上から判断しても、ELISA測定値に問題はないものと考えられる。ただ、HVAに関しては、HPLC、ELISA法共にカットオフ値以下のものが2検体あった。(表3)

表3 神経芽細胞腫症例 測定値

症例	病期	EIA		HPLC		発見施設名
		VMA	HVA	VMA	HVA	
1	NS	523	599	347	447	化血研
2	NS	164	99	102	92	化血研
3	Ⅲ	244	159	214	150	化血研
4	I	41	43	26	33	化血研
5	Ⅲ	50	64	30	41	化血研
6	I	28	44	23	23	化血研
7	Ⅱ	25	25	19	25	化血研
8	Ⅲ	47	163	58	205	札幌市衛生研
9	I	27	27	18	24	札幌市衛生研
カットオフ値 (Mean±2.5S. D.)		21	33	14	28	($\mu\text{g}/\text{mgCRBA}$)

(考察) ELISA法使用の妥当性の検討のため、実際のマス・スクリーニングレベルでHPLC法による結果との比較検討を行ってきたが、上記の結果および測定再現性等も含め一次スクリーニング試薬として充分使用可能なレベルにあるものと考えられる。

HVAの一部に、非特異的に高値を示していると思われる検体が一部見られるが、この原因は現在明確化できていない。ただ、検体が古くなることにより、この現象が見られることは確実であり、原因物質の同定を進めると共に、検体が細菌等で汚染しないなどの適切な採取、輸送方法を確立することも必要かと考えている。また、これらの検体については、酢酸エチル抽出によるELISA法、もしくはHPLC法等の二次検査で解決出来る

ものであり、スクリーニングを行う場合の本格的な妨げとはならないものと考えている。

HPLC法がカットオフ以上でELISA法がカットオフ以下の検体が0.2~0.3%見られるが、ただ、このHPLC法による値が、真のVMAあるいはHVAを示すかどうかの問題もある。MinneapolisのTuckmanらは、HPLC法ではVMA、HVAのピークに他の物質が混入することが少なくないので、二次検査としては、ガスクロマト質量分析法で確認しつつスクリーニングを行っている。我々の場合、そこまで厳密に分析することは出来なかった。また、HPLC法の測定が終わった検体を、少し遅れてELISA法で測定しその後両者の結果の照合を行ったので、これらのグループの検体を詳しく分析することが出来なかった。

ただ、表2に示す様に、VMAで見える限り実際の値としては、HPLC法でカットオフ以上といってもごく軽度の上昇のものであり、ELISA法の測定値もあまり大きくずれてはいない。現実のスクリーニングのためには、表3での結果、即ち、患者は全例ピックアップ出来ているということがより大切なデータであると考えている。これらの事実から、ELISA法もマススクリーニングの方法として、採用し得る段階に到達していると考えてよいであろう。

ただ、この両者の測定値の差のある検体については、出来れば、ガスクロマト質量分析計あるいは、多チャンネルディテクターを持つ特殊なHPLC法などの詳しい分析を行うことが出来れば、HPLC法自身の信頼限界を知るためにも好都合であろう。この点、今後の研究の継続が大切であると考えている。

要約 現在日本の神経芽細胞腫スクリーニングは HPLC 法が推進されているが、マス・スクリーニングの方法としては、いくつかの短所を含み、必ずしも全ての施設にとって適切な方法ではない。そこで、第一次マス・スクリーニングのためのものとしては ELISA 法の使用が考えられる。我々は、化血研、札幌市衛研で HPLC 法でスクリーニングを行った検体を、すぐに結果を知らせることなく送付し、全くブラインドで ELISA 法を実施し、この二つの異なる方法による結果を対比させ、ELISA 法の妥当性を分析した。ELISA 法としては、ヤマサ醤油(株)の VMA・HVA 測定キットを用いた。40,780 検体分析の結果、一応よい相関がみられ、この間 9 例の患者があったが、ELISA 法でも全員発見されていた。この方法も現実のスクリーニング方法として採用可能であろう。