

平成3年度厚生省心身障害研究
「代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング、
進行阻止及び長期管理に関する研究」

7位17-OHPキットの比較検討

(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)

小松和男、石川孝子、高田五郎

要約: 4社 (E、C、F、K社) より出そろってきた7位17-OHPのELISAキットについて比較検討した。新生児740検体につき、直接法のオーバーナイト法にて測定したところ、E、C、K社では平均値約2.5ng/mlのヒストグラムを呈したが、F社の平均値は9.3ng/mlと比較的高値を示した。キットとしての交差反応率を各種ステロイドの乾燥濾紙血を作製して求めたところ、3位のキットで問題となっていた 17α -OH-Pregnenolone-3-sulfateとの交差率は比較的低値であったが、Progesteroneとの交差率が平均7.4%と高値を示した。

17-OHPが比較的高値を示した新生児79検体について直接法と抽出法で同時に測定して比較検討したところ、直接法と抽出法との相関が最も良好であったのはE社であった。直接法と抽出法との差が最も小さかったのはモノクローナル抗体を用いているK社のキットであったが、同時再現性、日差再現性は他社のキットに比してやや不良であった。今後、再現性が良好でかつ他のステロイドとの交差反応が小さくて煩雑な抽出操作を省略し得る様に、キットをさらに改善する必要があると考えられる。

見出し語: 副腎過形成症マス・スクリーニング、7位17-OHPキット、交差反応、抽出法

研究目的: 副腎過形成症のマス・スクリーニング目的に、現在いくつかの17-OHP測定キットが実際に使用されているが、それらの測定キットにはいくつかの問題点も存在する。その一つは、様々なステロイドとの交差反応を有することから各キットによってその測定値が異なり、クレチニン症のTSHのよう

に絶対値での比較が困難である点である。そのため17-OHP値の判定の際には、とくに水溶性ステロイドとの交差反応を除くために煩雑な抽出操作を必要としており、かつ抽出操作を行なっても純粋に17-OHP値のみを表現しているとは必ずしもいえないのが現状である。

最近、より交差反応が少ないとされる7位抗体の17-OHPキットが栄研科学、チバ・コーニング、フジ・レビオ、化血研の4社より出そろってきており、同時に測定する機会を得たので比較検討を行なった。

再現性が良好であり、かつ交差反応が小さくて直接法と抽出法との差が小さく、煩雑な抽出操作を必要としなくてもより真の17-OHP値に近い値を示し得るキットであるか否かを検討するのが本研究の目的である。

方法：表1にE、C、F、Kの4社のキット仕様を示す。いずれも7位結合体に対する抗体を用いているが、特にK社はモノクローナル抗体を用いている点に特徴がある。

1) 新生児740検体につき、4社のキットを用い直接法のオーバーナイト法にて17-OHP値を測定し、そのヒストグラムも求めた。

2) 各種ステロイドとの交差反応性を検討した。はじめに各種のステロイド一定量をステロイド除去血清に溶解して既知濃度の標準ステロイド溶液を作製した。つぎに濃厚赤血球溶液を添加してHtが50%になるように調整し、各種のステロイドの標準濃度の乾燥濾紙血を作製した。これら各種のステロイドの標準濃度の乾燥濾紙血及び17-OHP濾紙血を用い、4社のキットにて吸光度を測定して検量線を作製した。それぞれの検量線よりB/B0が50%になる濃度をそれぞれ求め、その定量値の比からキットとしての17-OHPに対する交差反応率を算出した。

3) 各キットの再現性について、同一プレート内での同時再現性及び異なるアッセイ日での日差再現性について直接法にて検討した。

検討は異なる3濃度のコントロール検体（コントロール1、2、3）を用いて行なった。

4) 新生児740検体のうち、直接法で上位5%タイルを示した79検体、及び副腎過形成症の患者延べ12検体の高濃度検体について直接法及び抽出法にて測定し、比較検討を行なった。抽出法は常法通り、ジエチルエーテル抽出を行なった後に直接法に準じて行なった。

結果：1) 新生児740検体について17-OHP（単位ng/ml）直接法で測定した値の平均値を表2、そのヒストグラムを図1に示した。E、C、K社はいずれも平均値が約2.5ng/mlとほぼ一致した値を示したが、F社は平均値が9.3ng/mlとかなり高値側によっていた。

2) 各種のステロイドとの交差反応性については表3の通りであり、図2に図示した。3位17-OHPキットでは高い交差率を示している17 α -OH-Pregnenolone-3-sulfateは、E社で0.23%、F社で0.36%と交差反応がわずかに見られたが、他のキットでは見られなかった。各キットに共通して高い交差反応がみられたのはProgesteroneで、E社12.1%、C社9.0%、F社2.6%、K社6.0%で、平均7.4%という結果であった。その他ではF社が21-Deoxy-cortisolで0.67%と他のキットに比し高い交差反応を示した。

3) 各キットの同時再現性の結果を表4に示した。E、C、F社のキットは変化率(CV)がいずれも比較的良好な結果を示したが、K社はややCVが高値を示した。

各キットの日差再現性を表5に示す。やは

り K 社のキットが他のキットに比し、 CV がやや高値を示した。

4) 17-OHP 値が比較的高値を示した新生児 79 検体及び患者延べ 12 検体の合計 91 検体について直接法及び抽出法で同時測定した結果をそれぞれ表 6 及び表 7 に示した。また直接法及び抽出法の測定値の相関を比較した結果を図 3 に示した。新生児検体の他に高濃度の患者検体を含んだ場合、直接法と抽出法との相関では E 社が相関係数 $r = 0.93$ と最も良好であった。新生児 79 検体のみでの相関でもやはり E 社が $r = 0.90$ と最も相関が良好であった。新生児 79 検体の E 社のキットでの直接法と抽出法の相関図を図 4 に示した。

どのキットでの測定値が眞の 17-OHP 値に近いかということは不明であるが、直接法と抽出法の間の相関が最も良好であった E 社の抽出法での値を基準として、各社のキットでの直接法、及び抽出法での値との相関を比較検討した。その結果を図 5 に示すが、 E 社の抽出法と良好な相関を示したのは E 社の直接法、及び F 社の抽出法であり、相関係数はそれぞれ $r = 0.90$ 及び 0.92 であった。

考案：7 位結合体を用いた 17-OHP の E LISA キットは 3 位のキットに比し、相対的に交差反応が少なくなったためか 17-OHP の平均値はより低下を示した。しかし、 F 社のキットは平均値が比較的高く、 3 位の 17-OHP キットに近い値を示したことから今後の検討を要するものと思われる。他のステロイドとの交差反応の比較検討の結果では、 3 位のキットで問題となった 17α -OH-

Pregnenolone-3-sulfate との交差反応は比較的少なかったが、 3 位のキットでそれほど問題にならなかった Progesterone などの交差反応率が新たに増加していた。本法は乾燥濾紙血を用い 17-OHP キットでの測定系全体での交差率をみているものであり、抗体と直接の交差率をみているものではないが、抗体の特異性についてはさらに改良を要するものと考えられる。

再現性の検討では、 E 、 C 、 F 社のキットは同時再現性及び日差再現性いずれも CV が比較的良好であったが、 K 社のキットはやや不良であった。測定時、 K 社のキットは洗浄方法などで微妙に影響を受けやすく、この不安定性が再現性不良の原因の一つとも考えられる。

直接法と抽出法の差が少ないほど、抽出操作が不要となり得ることから、特にカットオフ付近の値で直接法と抽出法の値の比較検討を行なってみた。新生児 740 検体の直接法での測定結果を基にし、その平均値 $\pm 3SD$ 値を計算によって求め、この直接法での値に対し、直接法と抽出法との相関から抽出法での値を算出し、比較した結果を図 6 に示した。直接法と抽出法の値の差が最も少なかったのは K 社のキットであり、直接法のみで測定し得る可能性があるが、再現性の点で未だ改良する点が残されている。今後、より特異性の高い抗体により直接法のみで眞の 17-OHP 値を安定して表し得るように、キットをさらに改善する必要があると考えられる。最後に、ご協力いただいた栄研化学、チバ・コーニング及び札幌 I D L 、フジ・レビオ、化血研の諸氏に感謝致します。

表1 17-OHP キット仕様

	E社	C社	F社	K社
製品名	D-E L I S A "栄研"	エンザブレートN 17 α -OHP-7	フレライザ 17 α -OHP	副腎過形成症 スクリーニングキット
第一抗体	抗17-OHP ウサギ血清	抗 α -OHP-BSA ウサギ血清	抗17-OHP ウサギ血清	抗17-OHPマウス モノクローナル抗体
酵素標識 抗原	POD標識 17 α -OHP	HRP標識 17 α -OHP	HRP標識 17 α -OHP	POD標識 17 α -OHP
第二抗体 固相ブレート	抗ウサギ IgG抗体	抗ウサギ IgG抗体	抗ウサギ IgG抗体	抗マウスウサギ IgG抗体
発色剤	ABTS	O-フェニレン ジアミン	アジノビス ジアミン	TMBZ

表2 新生児740検体の17-OHP値(直接法)

	E社	C社	F社	K社
平均値	2.4	2.5	9.3	2.6
標準偏差	1.5	0.9	4.6	0.9

n = 740 単位: ng/ml

図1 ヒストグラム

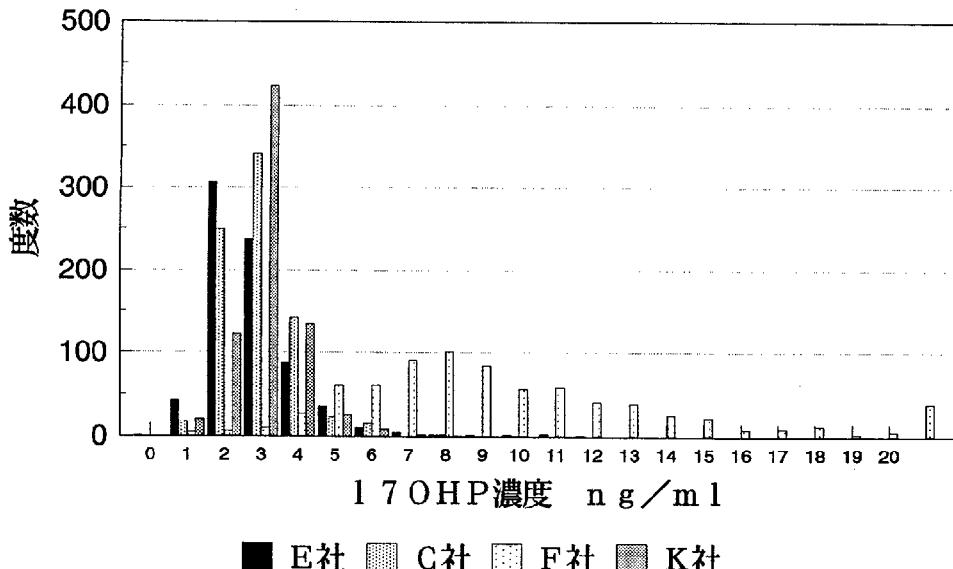


表3 17-OHP交差反応率(%)

ステロイド名	E社	C社	F社	K社
Pregnenolone	0.012	0.016	0.017	0.06
17 α OH-pregnenolone	0.03	0.03	0.43	0.14
Progesterone	12.1	9.04	2.60	6.00
Deoxycorticosterone	0.07	0.17	0.20	0.02
11-deoxycortisol	0.05	0.51	0.001	0.02
Cortisol	<0.001	0.03	0.04	<0.001
Cortisone	<0.001	<0.001	0.016	0.16
21-deoxycortisol	0.20	0.11	0.67	0.26
Dehydroepiandrosterone	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
17 α OH-progesterone	0.23	<0.001	0.36	0.07
-3-sulfate				

図2 各種ステロイドとの交叉反応

各種ステロイド

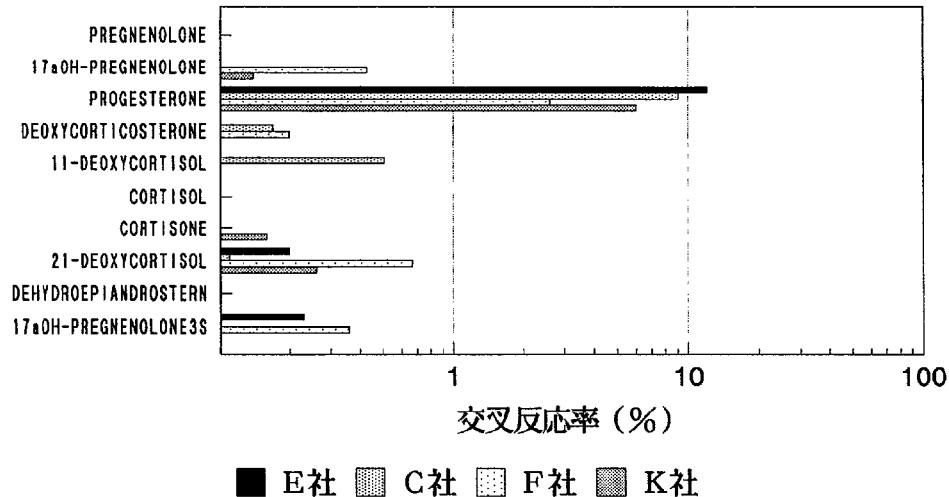


表4 各キットの17-OHP同時再現性

	E社	C社	F社	K社
	M ± SD (CV %)			
Control I	5.4 ± 0.5 (8.5)	5.8 ± 0.5 (8.4)	5.8 ± 0.2 (3.3)	6.5 ± 0.8 (11.7)
Control II	12.1 ± 1.1 (9.3)	11.5 ± 0.6 (5.5)	11.6 ± 0.8 (6.9)	14.4 ± 1.3 (8.8)
Control III	57.2 ± 4.1 (7.1)	51.7 ± 1.9 (3.7)	53.6 ± 0.8 (5.4)	74.2 ± 10.1 (13.6)

n=10 単位: ng/ml

表 6 新生児 79 検体での $I - T - O H P$ 値 (ng/ml)

(直接法と抽出法の同時比較)

No	E 社		C 社		F 社		K 社	
	D 法	E 法	D 法	E 法	D 法	E 法	D 法	E 法
1	2.3	1.4	4.7	2.9	24.0	3.4	2.2	3.5
2	3.9	0.8	4.1	2.2	17.4	2.8	3.4	3.5
3	14.2	3.2	5.7	3.8	24.5	6.8	5.4	5.7
4	6.0	1.3	3.1	2.8	22.4	3.6	5.8	5.2
5	5.5	0.9	3.4	3.6	22.7	3.7	4.4	3.0
6	5.7	2.3	4.6	2.8	25.8	3.6	6.5	4.5
7	9.5	2.0	4.7	3.1	27.8	2.4	5.9	5.8
8	4.7	1.7	2.7	2.6	30.4	3.3	4.2	3.0
9	4.2	0.8	2.3	6.0	18.1	2.8	4.0	4.3
10	3.5	0.6	2.5	1.6	20.9	2.1	4.4	0.6
11	2.0	1.1	3.4	1.4	12.9	2.5	3.5	2.8
12	1.7	0.5	2.2	0.7	8.7	1.8	3.8	4.3
13	2.8	1.3	4.0	2.3	14.8	2.3	3.7	3.4
14	20.7	4.0	9.0	7.1	39.6	5.8	9.7	6.8
15	6.4	2.0	5.8	2.1	25.7	3.2	5.6	5.7
16	2.6	0.9	3.5	1.1	17.7	2.3	4.6	2.1
17	2.3	0.5	3.4	1.9	12.8	2.2	3.9	5.3
18	3.5	1.7	4.2	1.7	19.7	1.9	4.9	5.7
19	3.5	1.1	2.5	1.5	14.2	2.3	4.5	4.2
20	4.8	2.0	5.1	2.3	24.2	3.1	3.3	5.7
21	4.0	1.6	3.4	1.3	17.1	3.3	4.3	3.9
22	4.3	1.4	4.5	1.9	21.0	2.8	4.7	4.3
23	12.2	4.3	8.1	3.6	32.8	7.0	6.2	6.7
24	3.7	1.1	3.6	1.4	11.7	2.0	3.6	3.9
25	12.6	3.2	7.2	5.6	23.6	5.5	5.9	5.6
26	3.5	0.5	3.4	0.6	17.7	1.9	5.7	4.9
27	5.1	1.9	5.2	2.5	17.3	2.8	4.1	8.7
28	3.8	1.5	5.1	1.2	17.4	2.5	5.5	5.7
29	4.9	1.5	4.0	2.1	17.8	1.5	4.8	4.0
30	4.7	2.0	3.4	2.0	19.1	3.2	3.9	6.6
31	3.8	0.8	3.9	1.2	14.6	1.4	4.1	4.0
32	3.7	0.8	3.2	3.1	20.5	1.9	3.3	3.9
33	4.2	0.8	3.2	1.1	20.1	2.2	4.1	3.6
34	3.6	0.8	2.7	1.1	14.0	1.8	4.9	4.3
35	6.4	2.6	5.2	2.7	23.2	4.0	6.1	6.0
36	3.6	0.8	4.0	1.9	23.2	2.2	4.7	4.3
37	7.1	2.3	5.2	2.0	24.7	3.7	5.9	5.1
38	4.5	2.0	3.3	1.7	21.4	3.2	4.3	5.2
39	3.2	1.1	3.2	1.7	13.8	1.9	4.2	4.6
40	9.1	3.2	5.1	3.3	28.7	4.4	5.5	5.5
41	23.1	6.3	8.7	6.2	49.6	11.1	11.3	9.5
42	10.1	2.9	4.0	3.8	20.5	4.8	5.6	6.6
43	3.6	2.1	2.9	1.4	21.1	1.7	4.4	4.2
44	3.5	1.2	3.2	1.4	21.1	2.6	3.0	3.6
45	3.5	0.8	1.3	1.0	14.1	1.9	3.7	2.5
46	5.5	0.8	3.4	1.6	22.4	0.9	5.2	3.3
47	4.4	2.0	3.3	2.5	18.6	2.8	2.4	4.9
48	5.1	1.4	3.0	1.8	20.6	2.0	4.2	3.8
49	8.0	2.8	4.1	4.1	21.9	4.4	4.9	6.8
50	3.6	0.8	7.8	1.2	13.8	1.5	2.6	3.2
51	3.3	0.8	3.0	1.4	16.0	1.7	3.7	3.5
52	4.0	1.7	3.2	2.1	25.0	3.0	4.6	4.9
53	5.1	1.4	2.7	2.2	26.5	2.4	5.0	4.4
54	3.2	0.8	1.9	0.6	16.3	1.6	3.3	3.7
55	5.7	2.1	3.0	1.4	21.5	3.4	3.3	6.2
56	7.4	2.8	4.6	0.9	30.9	4.2	5.3	5.8
57	29.7	5.9	7.6	4.2	47.2	9.2	13.7	9.0
58	3.8	0.8	2.4	0.2	20.1	2.2	2.3	4.6
59	5.2	1.3	2.8	0.2	21.7	2.2	3.6	3.8
60	3.8	0.8	3.6	0.2	18.7	1.6	4.4	4.0
61	3.0	0.8	2.8	1.2	19.3	1.5	3.5	3.7
62	5.0	1.3	2.8	0.6	21.5	2.0	4.1	3.8
63	4.1	1.1	3.2	0.2	20.0	1.7	3.8	4.4
64	20.2	5.6	7.7	3.4	36.7	9.3	7.0	8.5
65	6.0	0.8	4.1	1.7	28.9	0.2	4.8	1.2
66	2.9	0.8	2.7	1.4	17.0	1.1	4.1	2.5
67	3.9	1.7	2.1	0.2	20.2	1.8	3.9	3.7
68	4.4	1.5	3.4	0.5	23.6	1.7	3.9	2.9
69	3.9	2.0	2.3	0.2	16.4	2.3	5.0	3.7
70	4.0	0.8	2.3	0.2	24.1	1.1	4.3	3.6
71	4.1	1.5	2.5	0.5	23.5	2.2	5.2	2.6
72	5.3	2.6	4.2	1.2	24.7	2.9	6.8	3.7
73	4.2	1.3	3.0	0.6	26.0	1.7	4.6	2.0
74	4.1	1.6	2.4	0.8	19.5	1.8	5.5	6.7
75	4.4	1.7	2.8	1.2	23.8	2.1	4.0	2.9
76	5.8	2.4	3.1	1.3	21.0	2.5	3.5	3.5
77	3.0	0.8	1.3	0.2	12.3	1.1	2.4	2.7
78	3.8	1.0	2.3	1.2	13.8	1.0	2.9	4.3
79	4.3	0.8	2.9	0.4	19.7	1.4	5.3	2.2

平均値 5.8 1.7 3.8 1.9 21.8 2.9 4.7 4.5
標準偏差 4.7 1.2 1.6 1.4 6.9 1.9 1.7 1.7

表5 各キットのI7-OHP日差再現性

	E社	C社	F社	K社
	M ± SD (CV %)	M ± SD (CV %)	M ± SD (CV %)	M ± SD (CV %)
Control I	5.5 ± 0.5 (11.6)	5.6 ± 0.5 (5.6)	5.6 ± 0.2 (4.3)	6.7 ± 1.1 (16.0)
Control II	11.4 ± 1.0 (9.0)	10.5 ± 1.0 (9.9)	11.3 ± 1.2 (11.0)	13.7 ± 1.7 (12.0)
Control III	55.7 ± 10.5 (18.8)	47.1 ± 4.4 (9.6)	53.9 ± 12.2 (22.7)	68.6 ± 7.6 (11.1)

n=10 単位: ng/ml

表7 患者12検体でのI7-OHP値 (ng/ml)
(直接法と抽出法の同時比較)

No.	E社		C社		F社		K社	
	D法	E法	D法	E法	D法	E法	D法	E法
1	135.8	118.1	116.0	88.5	194.3	129.1	95.6	95.6
2	9.1	8.8	9.2	8.0	26.0	13.2	9.9	8.8
3	71.0	75.4	61.3	60.5	72.2	77.0	100.2	83.2
4	76.7	69.0	59.6	52.3	68.3	63.9	88.5	68.5
5	135.8	123.8	112.8	82.1	157.0	129.7	154.7	127.3
6	9.1	8.9	6.4	6.4	10.7	13.1	6.1	9.9
7	118.8	73.7	72.2	43.7	176.4	72.0	141.8	76.1
8	300.0	209.8	243.3	182.4	226.7	208.1	160.0	152.7
9	48.3	76.2	84.9	47.3	143.8	85.9	94.8	79.9
10	94.7	103.0	176.4	99.9	233.6	180.3	158.5	132.5
11	48.3	52.2	49.8	47.9	51.1	50.9	84.8	62.3
12	10.6	9.7	8.4	8.7	14.5	14.8	7.7	13.2
平均値	88.2	84.0	83.3	57.3	114.5	88.2	91.9	76.1
標準偏差	77.7	62.4	68.0	47.3	79.7	61.0	55.4	45.8

図3 直接法と抽出法の相関

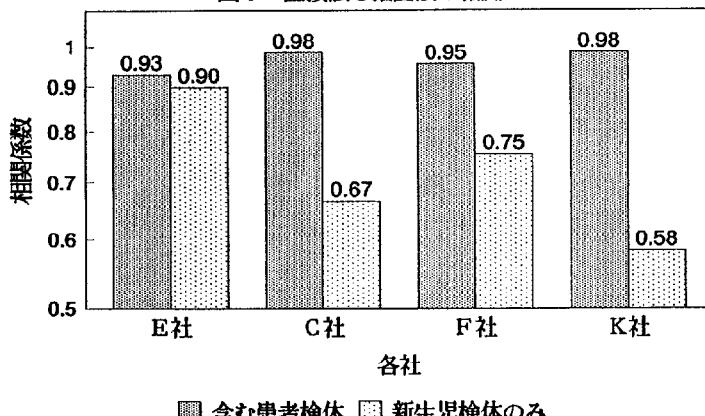


図4 直接法と抽出法の比較 (E社)

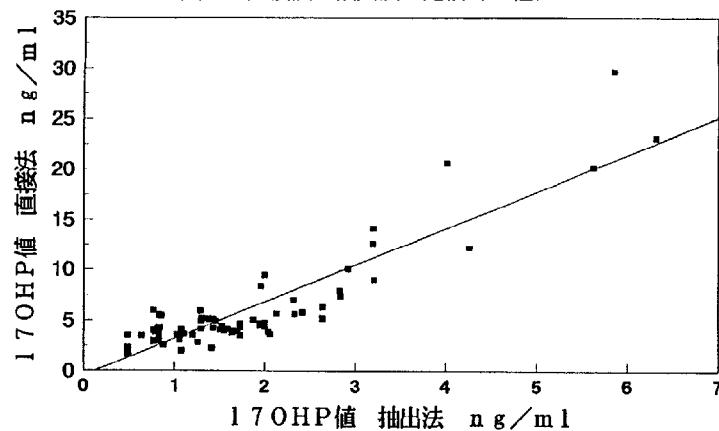


図5 E社抽出法と各社の直接法及び抽出法との相関

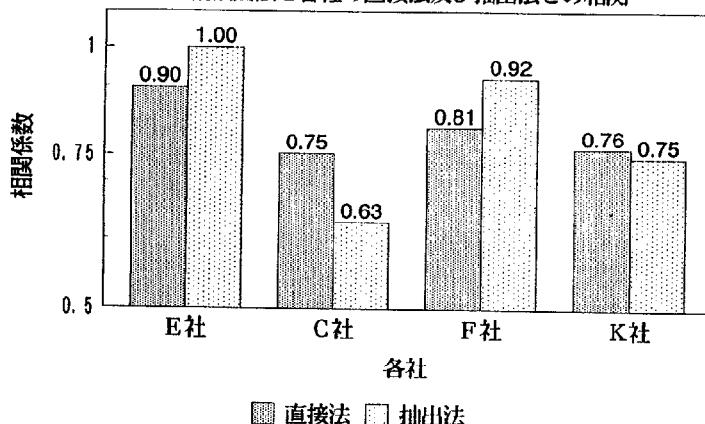
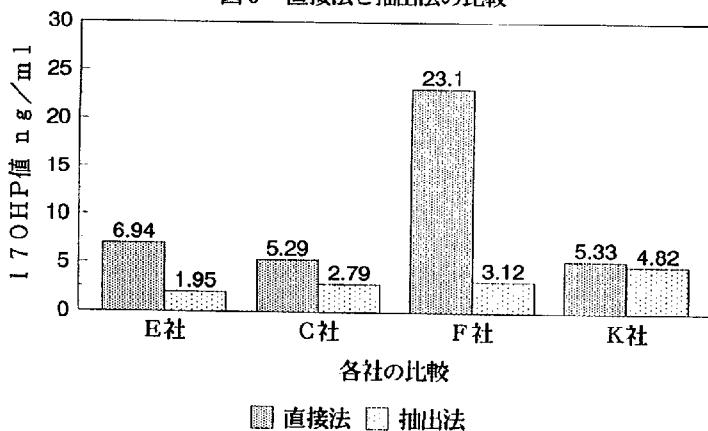
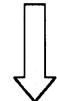


図6 直接法と抽出法の比較





検索用テキスト OCR(光学的文書認識)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:4社(E、C、F、K社)よりそろっててきた7位17-OHPのELISAキットについて比較検討した。新生児740検体につき、直接法のオーバーナイト法にて測定したところ、E、C、K社では平均値約2.5ng/mlのヒストグラムを呈したが、F社の平均値は9.3ng/mlと比較的高値を示した。キットとしての交差反応率を各種ステロイドの乾燥濾紙血を作製して求めたところ、3位のキットで問題となっていた17-OH-Pregnenol-3-sulfateとの交差率は比較的底値であったが、Progesteroneとの交差率が平均7.4%と高値を示した。

17-OHPが比較的高値を示した新生児79検体について直接法と抽出法で同時に測定して比較検討したところ、直接法と抽出法との相関が最も良好であったのはE社であった。直接法と抽出法との差が最も小さかったのはモノクローナル抗体を用いているK社のキットであったが、同時再現性、日差再現性は他社のキットに比してやや不良であった。今後、再現性が良好でかつ他のステロイドとの交差反応が小さくて煩雑な抽出操作を省略し得る様に、キットをさらに改善する必要があると考えられる。