

プレート固相EIA法による乾燥濾紙血液中の 17-OHPおよびCortisolの測定

Micro-ELISA for Measurements of 17-OHP and Cortisol in Dried Blood Sample on Filter Paper

水嶋 好清 福士 勝 荒井 修 佐藤 泰昌
青木 襄 富所 謙吉 高杉 信男

Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi, Osamu
Arai, Yasumasa Sato, Minoru Aoki,
Kenkichi, Tomidokoro and Nobuo Takasugi

マイクロプレート固相法による乾燥濾紙血液中の17-OHP, Cortisol測定は、迅速簡便で再現性も良好であった。先天性副腎皮質過形成のマス・スクリーニング法として、17-OHP/Cortisol ratioは正常児と患児の判定が容易で、再採血率を17-OHP単独測定時の0.95%から0.25%に減少でき、マス・スクリーニングにより適していた。

1 緒 言

札幌市では、昭和57年4月、新生児マス・スクリーニングの一環として先天性副腎皮質過形成(CAH)のスクリーニングを開始し、その測定は第二抗体固相化ビーズ法による17-OHP EIAにより行ってきた。¹⁾しかし、その測定法は、手数のかかるジエチルエーテル抽出が必要なほか、再採血率も0.95%と高率なことから、今回、迅速簡便な方法で偽陽性率の低下をはかることを目的に、マイクロプレート固相化17-OHP, Cortisol EIAの開発を試み、マス・スクリーニングへの応用について検討した。

2 方 法

2-1 対 象

札幌市内で出生した新生児を対象に生後5~7日に採血された乾燥濾紙血液を試料とした。なお、CAH患児の試料はマス・スクリーニングで発見された初回採血時のものである。

2-2 試薬の調製

2-2-1 抗体の調製

17-OHP抗体は17-OHP-3-Carboxymethyl-oxime-BSAを、Cortisol抗体はCortisol-6-Carboxymethyl-oxime-BSAを家兎に免疫して作製し²⁾、用時、17-OHP抗体は0.1%牛血清アルブミン(FrV)含有0.05Mリン酸緩衝液(pH7.4, 以下PBS-BSA)で10万倍に、Cortisol抗体は800倍に希釈した。

2-2-2 酵素標識抗原の調製

17-OHP-3-Carboxymethyl-oxime-Peroxidase conjugateおよびCortisol-3-Carboxymethyl-oxime-Peroxidase conjugateは混合酸無水物法により調製し³⁾、用時PBS-BSAで5,000倍に希釈した。

2-2-3 第二抗体固相化マイクロプレートの作製

第二抗体固相化マイクロプレートは、抗家兎IgG山羊血清IgG分画(Miles社製)をPBSで6 μ g Ab/ml濃度に希釈し、その0.1mlを各ウエルに分注

後、蒸発防止のためシールして、室温で2日間吸着させる。過剰のIgGをPBSで3回洗浄し、PBS-BSA 0.3mlを分注して4°Cで1日間2次吸着させ、PBS-BSAを除去して乾燥した。なお一部、液を除去しない湿潤プレートも4°Cに保存したが、いずれも6ヶ月まで安定であった。

2-2-4 標準濾紙血液の作製

あらかじめチャコール処理を行い、ステロイドフリーにした血清に、生理食塩水で5回洗浄した赤血球を加え、ヘマトクリット50%のステロイドフリー血液を調製し、次いで遠心分離を行って1割量の血清成分を除去し、同量の標準17-OHPまたは標準Cortisol溶液を加えた後、濾紙に滴下して風乾し、使用時まで-20°Cに保存した。

2-2-5 酵素反応基質および停止液の調製

17-OHP測定用の基質溶液として0.03% H₂O₂、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 4.5) と0.025% o-

phenylenediamine クエン酸塩緩衝液 (OPD溶液) の等量混液を調製し、Cortisol測定用の基質溶液はOPD溶液のみを0.1%として調製した。反応停止液は3N硫酸を使用した。

2-3 測定方法

乾燥濾紙血液中の17-OHPおよびCortisolの測定法を図1に示す。すなわち、17-OHPについては、標準濾紙血液および試料の3mmディスク1枚をそれぞれウェルにとり、抗体を0.1ml, conjugateを0.05ml分注して室温で18時間反応させた後、各ウェルを生理食塩水で3回洗浄し、基質溶液0.15mlを加えて、25°Cで30分酵素反応を行い、停止液0.1mlを加えて、イムノリーダーNJ-2000 (490nm) で吸光度を測定し、スタンダードカーブより、その濃度を算出した。Cortisolも17-OHPと同様に行ったが、酵素反応時間は25°C, 60分とした。

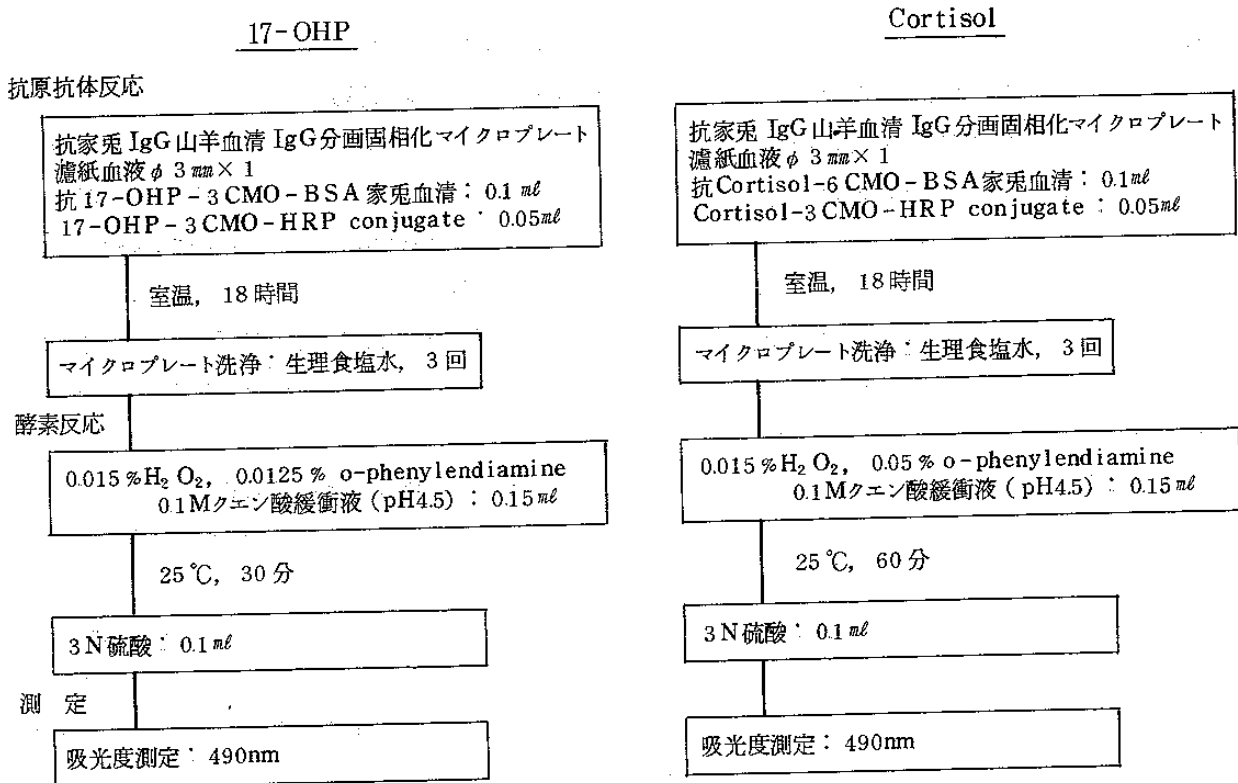


図1 マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液中の17-OHPおよびCortisol EIA

3 結果および考察

3-1 マイクロプレート作製条件の検討

第二抗体のコーティング濃度を6, 12, 25 $\mu\text{g Ab/ml}$ と変えて17-OHP EIAを行ったところ、プレートに結合する IgG 量は変化せず、同様なスタンダードカーブになった(図2)。従って、以後の測定はすべて最低濃度の6 $\mu\text{g Ab/ml}$ とした。また、コーティング時間を1, 2, 4日と変えると、2日目以降は変化が見られず、以後のコーティング時間は2日とした(図2)。

さらに、各社から市販されているエリサ用マイクロプレートをチェックしたところ、IgGの結合量に、ウェル間および各種プレート間に大きな変化が認め

られた(表1)。テストしたプレート中、A社エリサ用プレートが最も安定した結合量を示し、17-O

表1 各社のエリサ用マイクロプレートを用いた17-OHP EIAによる同一サンプルの吸光度の変動

n = 96

エリサ用マイクロプレート	吸光度(490nm)	CV%
A社	1.368 \pm 0.030	2.18
B社	1.379 \pm 0.060	4.38
C社	1.199 \pm 0.058	4.79
D社	1.478 \pm 0.090	6.09
E社(1)	1.318 \pm 0.129	9.75
E社(2)	0.657 \pm 0.070	10.65
F社	1.210 \pm 0.131	10.82

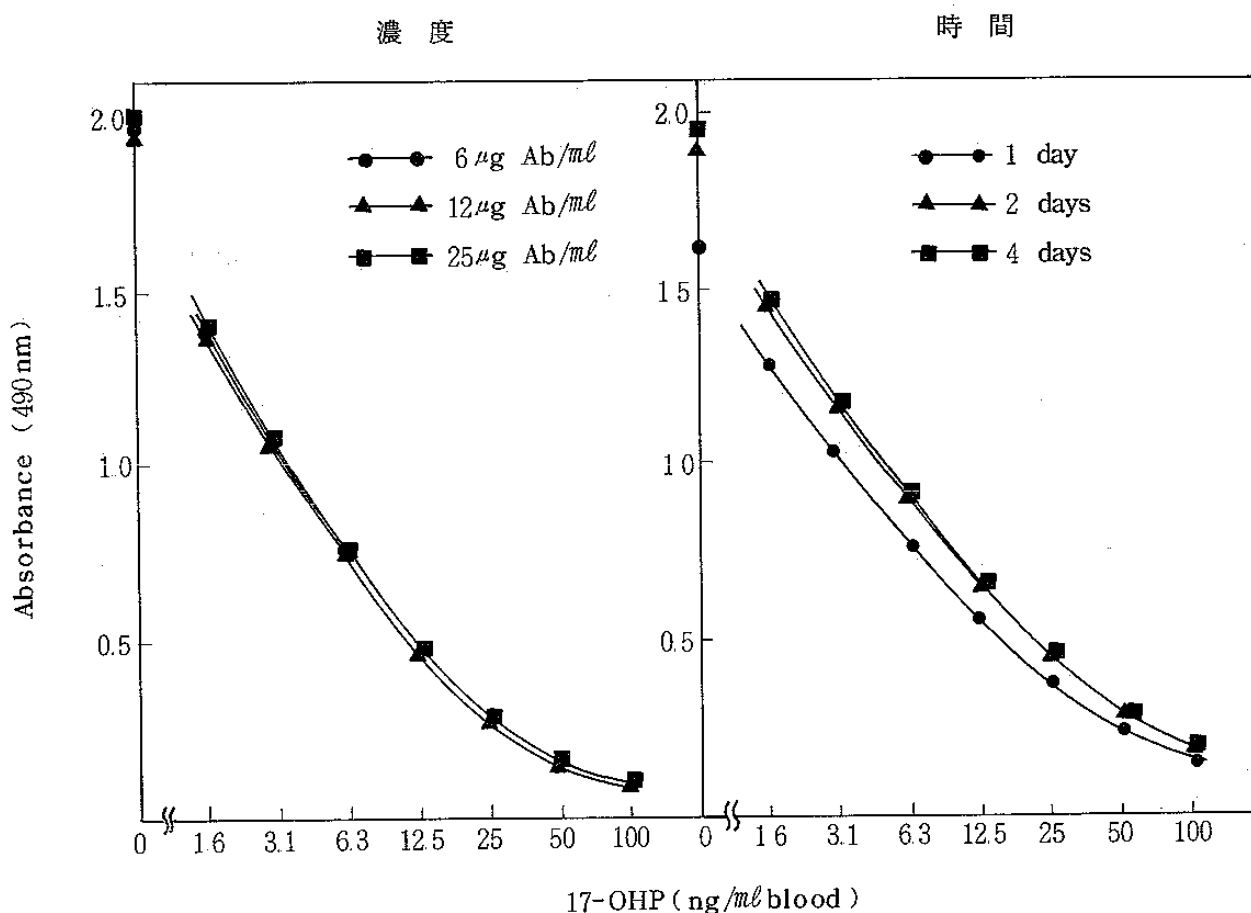


図2 17-OHPについての第二抗体コーティング濃度とコーティング時間のスタンダードカーブ

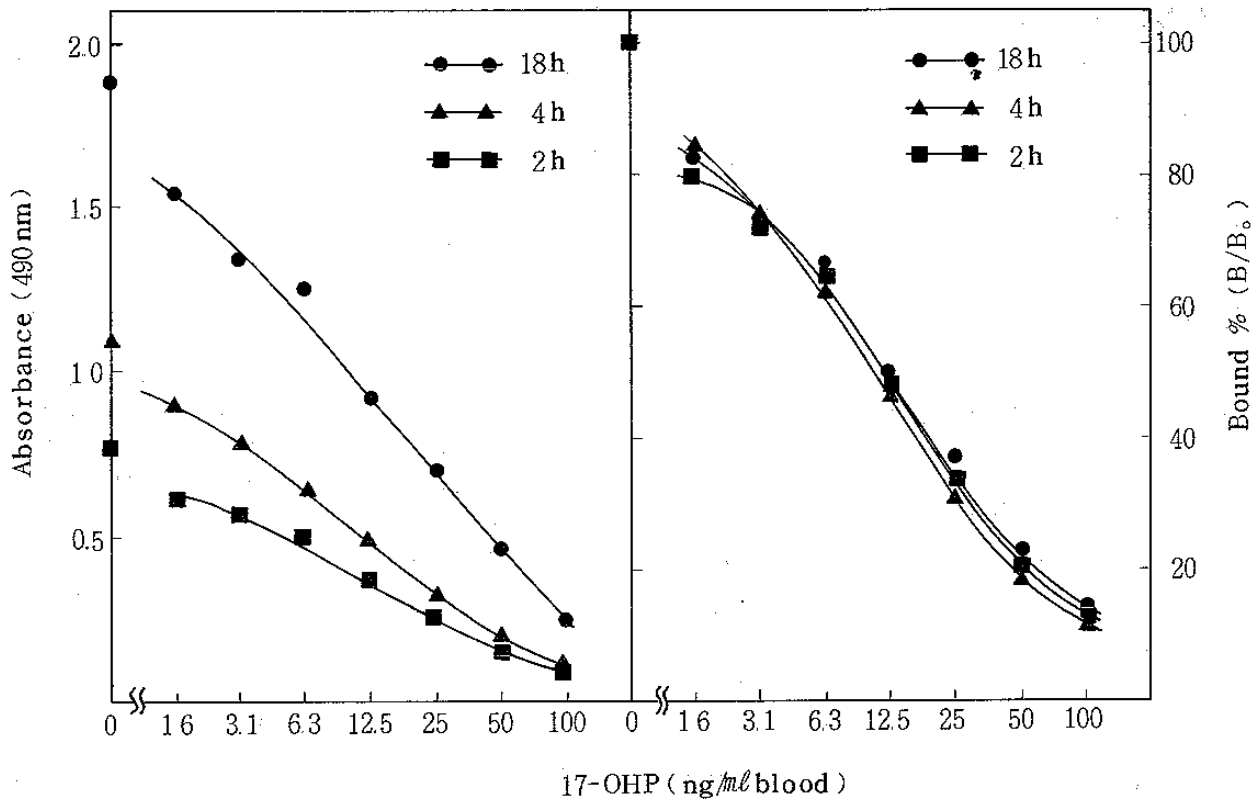


図3 インキュベーション時間の差異によるスタンダードカーブ

HPを同一試料についてプレート1枚分(96穴)を測定した結果、吸光度は 1.368 ± 0.030 、そのCV%は2.18%と良好な成績であった。また、このプレートを4回作製したときの吸光度のCV%は3.6%で、各回ごとのIgG結合量の変化は少なかった。

3-2 測定条件の検討

3-2-1 抗原抗体反応時間

抗体と conjugate 分注後の抗原抗体反応時間を2, 4, 18時間と変えて17-OHPの測定を行ったところ、吸光度は時間の経過とともに増加したが、B/B₀には変化は認められなかった(図3)。そこで、実際の測定は18時間で行った。

3-2-2 測定感度と precision profile

17-OHPおよびCortisolのスタンダードカーブ上の50%点は、それぞれ 5.0 ng/ml 、 150 ng/ml であり、測定感度はそれぞれ 1 ng/ml 、 10 ng/ml であった(図4)。また、precision profileの

CV%は、新生児についての測定範囲である17-OHPおよびCortisolのそれぞれ $3.1 \sim 25 \text{ ng/ml}$ 、 $32 \sim 250 \text{ ng/ml}$ の間が低く、それぞれ10%以下、15%以下とともに良好な精度であった。

3-2-3 再現性

17-OHPおよびCortisolについてのアッセイ内(Intraassay)、アッセイ間(Interassay)の変

表2 17-OHPとCortisolのアッセイ内、アッセイ間変動

Samples	n	17-OHP		Cortisol	
		Mean \pm SD (ng/ml blood)	CV (%)	Mean \pm SD (ng/ml blood)	CV (%)
Intraassay					
1	8	12.3 \pm 1.0	8.3	114.9 \pm 13.3	11.5
2	8	22.9 \pm 1.6	7.0	197.3 \pm 27.0	13.6
Interassay					
3	8	11.5 \pm 1.2	10.5	130.0 \pm 20.4	15.7
4	8	43.8 \pm 2.6	6.7	220.0 \pm 36.9	16.7

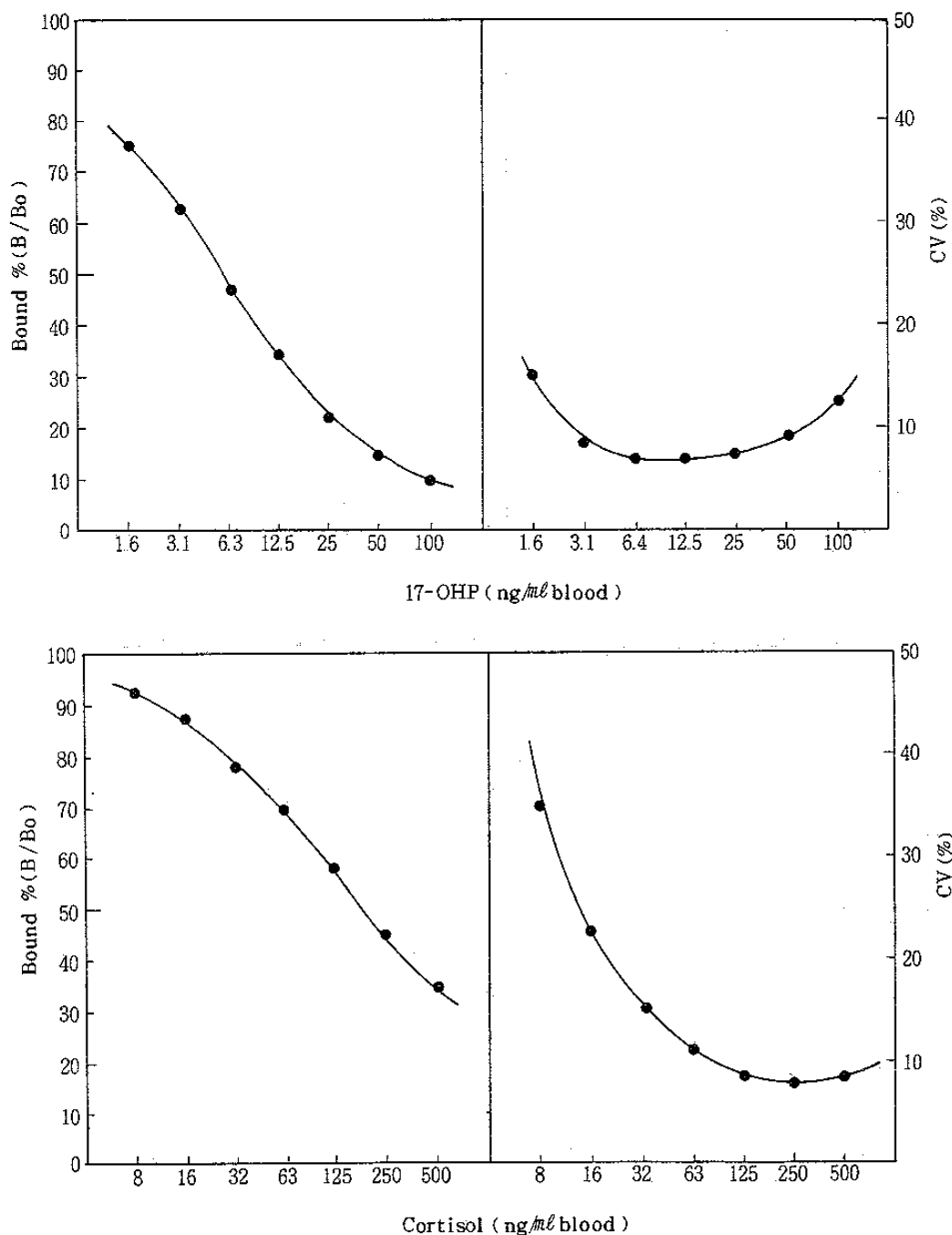


図4 17-OHPとCortisolのスタンダードカーブとprecision profile

動係数は、それぞれ6.7~10.5%, 11.5~16.7%であり、ともに良好な値を示した(表2)。

3-2-4 ビーズ固相法EIAと本法の相関

ビーズ固相法EIA¹⁾と本法との相関は、17-OHPでは $r = 0.961$, $y = 0.9556x - 3.66$, Cortisolでは $r = 0.887$, $y = 0.723x + 19.1$ ととも良好な相関を示した(図5)。

3-3 スクリーニングへの応用

3-3-1 正常新生児およびCAH患児についての測定値

新生児1,583例について本法により17-OHPとCortisolの測定を行い、さらに17-OHP/Cortisol ratioの算出を試みた。その結果、それぞれのヒストグラムはほぼ正規分布を示し、その $\text{mean} \pm \text{SD}$

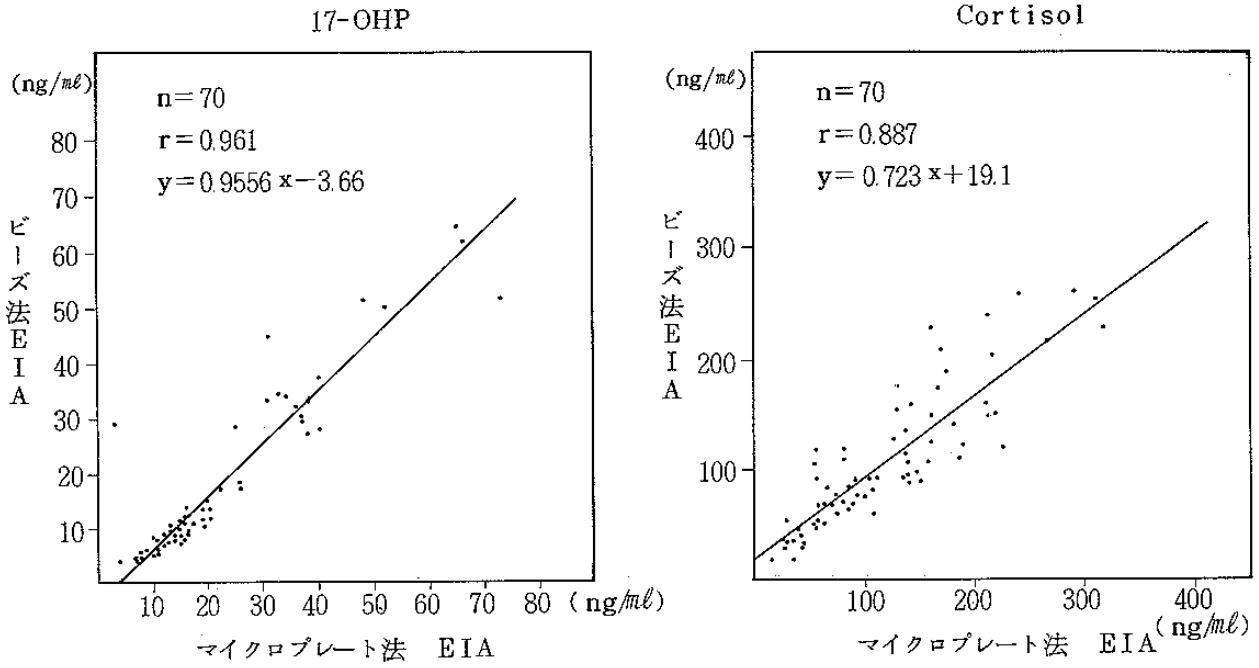


図5 17-OHPとCortisol EIAによるビーズ法とマイクロプレート法の相関

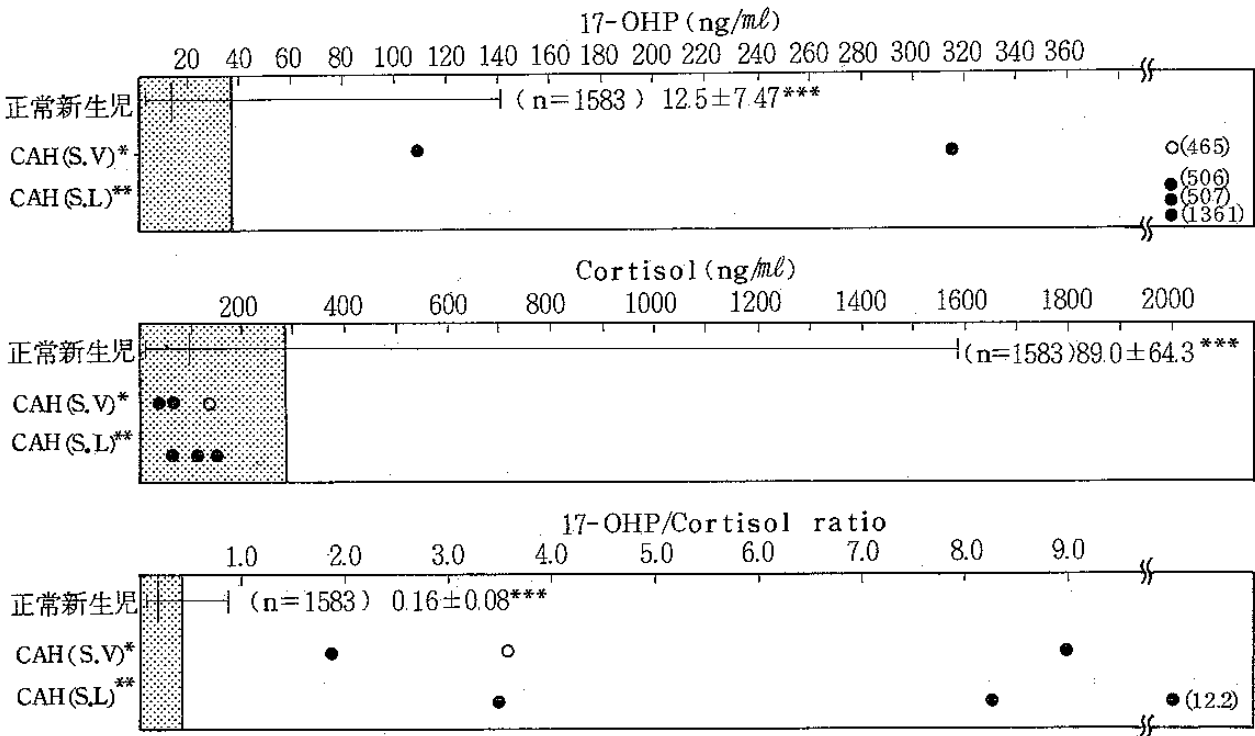


図6 正常新生児(1583例)と先天性副腎皮質過形成患児(6例)の17-OHP値, Cortisol値および17-OHP / Cortisol ratio

- * 先天性副腎皮質過形成(単純男性化型)
- ** 先天性副腎皮質過形成(食塩喪失型)
- *** Mean ± SD
- 男児 ● 女児

はそれぞれ $12.5 \pm 7.47 \text{ ng/ml}$ (レンジ 1.0~140) $89.0 \pm 64.3 \text{ ng/ml}$ (レンジ 10~1580), 0.16 ± 0.08 (レンジ 0.01~0.86) であった (図 6)。

また, CAHマス・スクリーニングで発見された CAH患児の初回検体について, 本法により, 17-OHPと Cortisol を測定したところ, 単純男性化型 3例の17-OHP値は 109, 315, 465 ng/ml , Cortisol 値は 58.9, 35.1, 131.0 ng/ml , ratio は 1.85, 8.97, 3.55 であり, 食塩喪失型 3例の17-OHP値は 1361, 507, 506 ng/ml , Cortisol 値は 111.2, 146.7, 61.3 ng/ml , ratio は 12.2, 3.46, 8.25 であった。

以上の結果より, CAH患児の17-OHP値にはアミで示した正常範囲 ($\text{mean} \pm 3\text{SD}$)に入る例がなく, 全例高値を示したが, 6例のうち単純男性化型の1例のみは正常レンジ内であった。一方, ratio

では全例異常高値であり, 正常範囲および正常レンジと完全に離れていた。

3-3-2 スクリーニングのカットオフ値

従来, ビーズ固相法17-OHP EIA (エーテル抽出法) では, カットオフ値を初回は97パーセントイル, 再測定では 5 ng/ml 以上に設定し, 再採血を行っているが, 1,583例のスクリーニング結果では 15例 (再採血率は0.95%) が再採血となった (表3)。

一方, これをマイクロプレート固相法17-OHP EIAで行った場合, そのカットオフ値を初回, 再測定ともに97パーセントイルとすると29例 (1.83%) で, 再測定を $\text{mean} + 3\text{SD}$ としても15例 (0.95%) の再採血となり, 17-OHPのみの測定では再採血率低下の効果は期待できない。

しかし, 本法による17-OHPと Cortisol の両者測定で, カットオフ値を初回, 再測定とともに17

表3 ビーズ固相法とプレート固相法のカットオフ値と再採血率および検出率の比較

	カットオフ値		検査数	再採血数	再採血率 (%)	検出率
	初回測定	再測定				
ビーズ固相法 (抽出法)	17-OHP 97パーセントイル	17-OHP 5 ng/ml	1,583	15 (4)*	0.95	6/6
プレート固相法	17-OHP 97パーセントイル	17-OHP 97パーセントイル	1,583	29 (4)	1.83	6/6
	17-OHP 97パーセントイル	17-OHP Mean + 3 SD	1,583	15 (4)	0.95	6/6
	17-OHP 97パーセントイル	17-OHP/Cortisol ratio 97パーセントイル値 (0.35)	1,583	4 (4)	0.25	6/6
	17-OHP/Cortisol ratio 97パーセントイル	17-OHP/Cortisol ratio 97パーセントイル	1,583	8 (4)	0.51	6/6

* () 内: 低出生体重児数

17-OHP / Cortisol ratio 97パーセントイルとしたところ8例(0.51%)に減少することができた。この両者測定は、操作が倍に増大する結果となる。

そこで、初回は本法による17-OHP測定を行い、97パーセントイル以上のものについてのみCortisolを測定し、ratioが97パーセントイル値(0.35)以上のもののみを再採血すると4例(0.25%)まで減少することができた。この4例は全例低出生体重児であった。

なお、マス・スクリーニングで発見されたCAH患児6例の検出率は、どのカットオフ値を採用しても同じであった。

4 結 語

マイクロプレート固相法による17-OHP, Cortisol EIAは迅速簡便で、再現性もよく、ビーズ固相法EIAとの相関も良好であった。また、試薬の安定性も良好で、マイクロプレートは4°C、6ヶ月まで十分使用可能であった。

プレート固相17-OHP EIAでは、正常レンジ中に1例の患児が入り、正常児と完全に分離されなかったが、17-OHP / Cortisol ratioでは完全に分離することができた。

従来のビーズ固相法17-OHP EIAでは、再採血率が0.95%と高率であったが、初回に本法による17-OHPを、再測定でCortisolを測定してratioを算出することにより、再採血率を0.25%と1/4に減少できた。

今後、CAHのマス・スクリーニングに、マイクロプレート固相EIA法による17-OHP, Cortisolの測定が有効であると考えられる。

5 文 献

- 1) 高杉信男, 福士勝, 荒井修, 水嶋好清, 前田博之, 林英夫, 松浦信夫, 藤枝憲二, 厚生省心身障害マス・スクリーニングに関する研究班, 昭和58年度研究報告書, 260-263 (1984)
- 2) 松浦信夫, 藤枝憲二: 厚生省心身障害小児慢性疾患研究班, 昭和57年度小児慢性疾患(内分泌, 代謝, 血液系)に関する研究報告書, 245-247 (1983)
- 3) Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A., Naruse, N., Suzuki, E. and Kambegawa, A.: Chem. Pharm. Bull., **31**, 2724 (1983)