

## 先天性副腎過形成症スクリーニング改良の試み

### ～ エンザプレート Neo-17 -0HP の基礎的検討 ～

三上 篤 本間 かおり 水嶋 好清 尾崎 恒一 藤田 晃三

#### 要 旨

CAH スクリーニング方法を改良する目的で、改良型抗体を用いる試薬であるエンザプレート Neo-17 -0HP について、基礎的検討および従来型試薬である N-17 -0HP や高感度 HPLC 法との比較等を行い、その有効性を検討した。その結果、低濃度から高濃度域まで ELISA 法として十分な再現性があり (17-0HP 直接法: CV=11.28-14.14%, 17-0HP 抽出法: CV=7.24-15.33%), 従来法よりも真値に近く信頼性のある結果が得られ (新生児検体 n=278 の HPLC 法対 17-0HP 抽出法相関: R=0.852, 患者検体 n=9 の同相関: R=0.981), 陽性者検出のためのカットオフ値の設定も可能なことから (17-0HP 抽出法 >4.5ng/ml), 改良型試薬の導入が有効なスクリーニング法構築のための一つの選択肢となることが示された。

#### 1. 緒 言

先天性副腎過形成症 (以下 CAH とする) マス・スクリーニングは、CAH 患者の約 90% を占める 21-水酸化酵素欠損症患者の早期発見・早期治療<sup>1)</sup> を目的として、1989 年以来、全国的に実施されている<sup>2)</sup>。本症を発見するための指標となる副腎皮質ステロイドホルモンの 1 種である 17 -ヒドロキシプロゲステロン (以下 17-0HP とする) は、酵素免疫測定法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay: ELISA)<sup>3)</sup> をはじめ、時間分解測定法等<sup>4,5)</sup> の様々な方法で測定可能である。しかし、国内では ELISA 法による乾燥紙血液用の測定キットが市販されているものの、いずれも 17-0HP 抗体の特異性が不十分であり、真の測定値が得られない。全国的に展開されているスクリーニングにおいて、真値を用いた結果の画一的評価ができないことは、スクリーニング担当者のみならず関係医療機関に対して、今後も多くの

混乱をもたらすと考えられ、新しい測定法の開発が永年の課題となっている。

このような状況から、バイエル・メディカル社によって、従来の 17-0HP 抗体より優れた特異性を有する改良型 ELISA 法試薬であるエンザプレート Neo-17 -0HP が開発された。すでにスクリーニングに採用したか、採用を検討している施設もあり、札幌市では 2002 年 4 月から従来法に代わって採用している。今回、改良型試薬の有効性について、その基礎的検討の他、従来型試薬および高感度 HPLC 法との比較等の検討を行い、良好な成績が得られたので報告する。

#### 2. 対象と方法

##### 2-1. 対 象

2001 年 8 月 -2002 年 9 月の期間に受付けた新生児と、治療・管理を目的とした CAH 患者を対象とした。

2-2. ELISA 法

2-2(1). 試薬と機器

エンザプレート N-17 -OHP (従来型, 以下 N キットとする。バイエル・メディカル), エンザプレート Neo-17 -OHP (改良型, 以下 Neo キットとする。バイエル・メディカル), ジエチルエーテル 300 (残留農薬検査用, 和光純薬工業), ダルベッコ PBS(-) (栄研化学), プレートリーダー (Emax, Molecular Devices), 冷却型遠心機 (KUBOTA7820, KUBOTA), 試験管ミキサー (ダイレクトミックス TS-100, サーマル化学工業), プレートミキサー (1296-001PLATESHAKE, LKB-Wallac) を使用した。

2-2(2). 17-OHP 直接法

キットの抗体固相化マイクロプレートに, 検体から 1/8 インチディスク 1 枚を打ち抜き, 用法どおり室温で抗原抗体反応を 16 時間行った後, 発色反応により 17-OHP を測定した (図-1)。

2-2(3). 17-OHP 抽出法

17-OHP 直接法の各測定単位 (アッセイ) において 97 パーセント以上を示した高値検体については, 検体中に存在する水溶性の交差反応物質を除去するために, PBS で溶出後にジエチルエーテルで

|   |         |
|---|---------|
| 抗家兔 IgG 抗体固相化マイクロプレート<br>1/8 インチディスク 1 枚<br>50 $\mu$ l の酵素標識抗原液<br>50 $\mu$ l の抗 17-OHP 家兔抗体液<br>プレートシェーカーで攪拌 | (30 秒間) |
| 25 $^{\circ}$ C で抗原抗体反応   | (16 時間) |
| マイクロプレート内容物廃棄   |         |
| プレートウォッシャーで洗浄<br>100 $\mu$ l の発色液   | (3 回/枚) |
| 25 $^{\circ}$ C で発色反応 (遮光)<br>100 $\mu$ l の反応停止液  |         |
| プレートシェーカーで攪拌  | (20 秒間) |
| 450*/650nm (二波長) で吸光度測定   |         |
| 濃度計算  |         |
| * N キットは 490nm を使用する。   |         |

図-1. 17-OHP 直接法

|   |           |
|---|-----------|
| 13 $\times$ 100mm ガラス試験管<br>1/8 インチディスク 1 枚<br>200 $\mu$ l の PBS(-) |           |
| 2300rpm-4 で遠心   | (5 分間)    |
| 超音波水槽で溶出<br>2ml のジエチルエーテル   | (5 分間)    |
| 試験管ミキサーで攪拌  | (5 分間)    |
| 2300rpm-4 で遠心   | (5 分間)    |
| ドライアイス-イタール槽で水相凍結<br>ジエチルエーテル相                                      | (20 秒間/本) |
| 12 $\times$ 75mm ガラス試験管   |           |
| N <sub>2</sub> 気流下で溶媒溜去・乾固<br>75 $\mu$ l の酵素標識抗原液                   | (15 分間)   |
| 試験管ミキサーで攪拌・復元<br>50 $\mu$ l の抗原+酵素標識抗原                              | (1 分間)    |
| 抗家兔 IgG 抗体固相化マイクロプレート<br>50 $\mu$ l の抗 17-OHP 家兔抗体液                 |           |
| プレートシェーカーで攪拌  | (30 秒間)   |
| (以下, 図-1. 17-OHP 直接法と同じ)  |           |

図-2. 17-OHP 抽出法

|   |           |
|---|-----------|
| 13 $\times$ 100mm ガラス試験管<br>5mm ディスク 4 枚<br>300 $\mu$ l の HPLC 用蒸留水 |           |
| 2300rpm-4 で遠心   | (5 分間)    |
| 超音波水槽で溶出<br>2ml のジエチルエーテル   | (5 分間)    |
| 試験管ミキサーで攪拌  | (5 分間)    |
| 2300rpm-4 で遠心   | (5 分間)    |
| ドライアイス-イタール槽で水相凍結<br>ジエチルエーテル相                                      | (20 秒間/本) |
| 12 $\times$ 75mm ガラス試験管   |           |
| N <sub>2</sub> 気流下で溶媒溜去・乾固<br>100 $\mu$ l の 11%アトニトリル               | (15 分間)   |
| 試験管ミキサーで攪拌・復元<br>95 $\mu$ l の復元液                                    | (10 秒間)   |
| オートサンブラー専用バール   |           |
| HPLC オートサンブラー   |           |

図-3. HPLC 分析用の試料前処理法

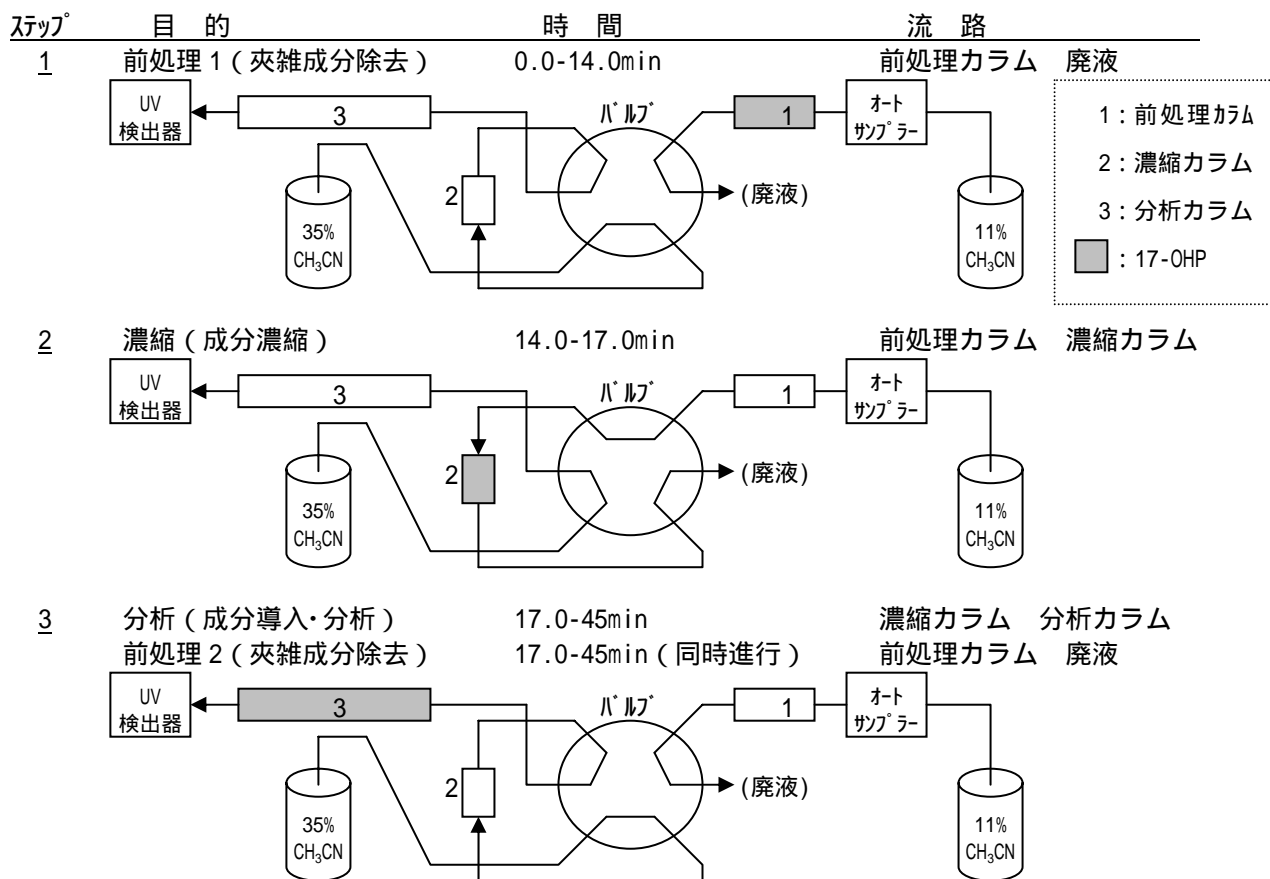


図-4. 高圧六方バルブを用いたカラムスイッチングによる 17-OHP 分析

抽出・復元した画分を試料として、室温で抗原抗体反応を 16 時間行った後、発色反応により 17-OHP を測定した (図-2)。

### 2-3. HPLC 法

#### 2-3(1). 試薬と機器

アセトニトリル (HPLC 用, 和光純薬工業), 蒸留水 (HPLC 用, 関東化学), 前処理カラム (CAPCELL PAK C18SG80MF(Ph1)S5, 1.5×50mm, 資生堂), 濃縮カラム (CAPCELL PAK C18UG120S5, 1.5×35mm, 資生堂), 分析カラム (CAPCELL PAK C18UG120S3, 1.5×150mm, 資生堂), ナノスペース SI-1 (内訳: 脱気装置 2009, ポンプ 2001×3 台, オートサンプラー 2003, カラム恒温槽 2014, 高圧切替六方バルブ 2012, UV-VIS 検出器 2002, 資生堂) を使用した。

#### 2-3(2). セミマイクロ HPLC 法

検体中に存在する水溶性の物質と紫外外部波長による検出を妨害する物質を除去するために、ジエチ

ルエーテルで抽出・復元した画分を試料とした (図-3)。分析は、注入した試料中の夾雑成分を前処理カラムで除去した後、17-OHP 画分をバルブ変換により濃縮カラムへ導入し、さらにバルブ変換により分析カラムへ導入して行った<sup>6,7)</sup> (図-4)。

### 3. 結果

#### 3-1. ELISA 法

##### 3-1(1). 標準曲線

Neo キットによる標準曲線を図-5 に示す。17-OHP 直接法の標準曲線の 90% 結合率における濃度は 0.8ng/ml, 50% 結合率では 8.3ng/ml であった。17-OHP 抽出法では、90% 結合率で 1.2ng/ml, 50% 結合率で 12.2ng/ml であった。Precision Profile の coefficient variation (以下 CV とする) は、1.0-93.5ng/ml で 2.0-5.9% (17-OHP 直接法) と 3.5-15.1% (17-OHP 抽出法) の範囲内であった。

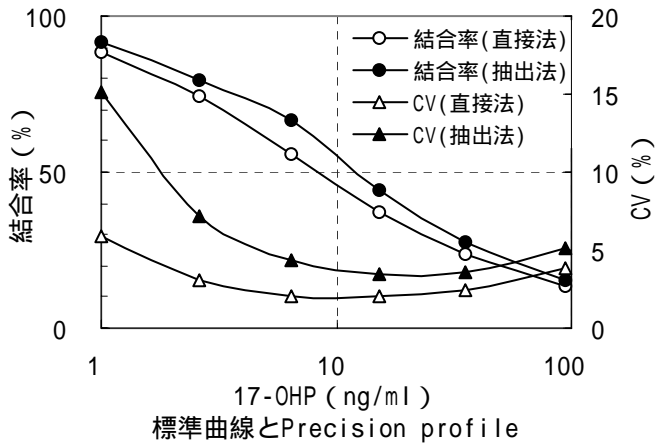


図-5.Neo キットの標準曲線と Precision profile

3-1(2).再現性

Neo キット添付の内部精度管理検体 3 種 (Mean ± SD: 2.5 ± 0.5, 6.9 ± 1.7, 21.2 ± 4.2ng/ml) について, 2 重測定により 17-OHP 直接法で 8 回, 17-OHP 抽出法で 5 回のアッセイにより測定間変動を検討した。17-OHP 直接法では CV=11.28-14.14%, 17-OHP 抽出法で CV=7.24-15.33%であった (表-1)。

表-1. 内部精度管理検体のアッセイ間変動

| 測定法 | 17-OHP直接法 |              |       | 17-OHP抽出法 |              |       |
|-----|-----------|--------------|-------|-----------|--------------|-------|
| 検体  | n         | Mean ± SD    | CV(%) | n         | Mean ± SD    | CV(%) |
| 低濃度 | 8         | 2.63 ± 0.37  | 14.14 | 5         | 2.61 ± 0.40  | 15.33 |
| 中濃度 | 8         | 6.80 ± 0.84  | 12.31 | 5         | 7.35 ± 0.97  | 13.24 |
| 高濃度 | 8         | 19.74 ± 2.23 | 11.28 | 5         | 21.62 ± 1.57 | 7.24  |

3-2.N キットとの比較

3-2(1).基本統計値 (新生児検体)

17-OHP 直接法による新生児の 17-OHP 値は, N キットの Mean ± SD=12.82 ± 5.15ng/ml (n=1,232) に

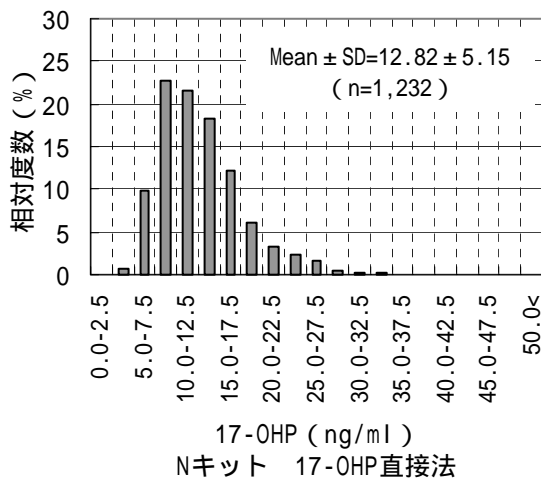


図-8.N キット 17-OHP 直接法の相対度数分布

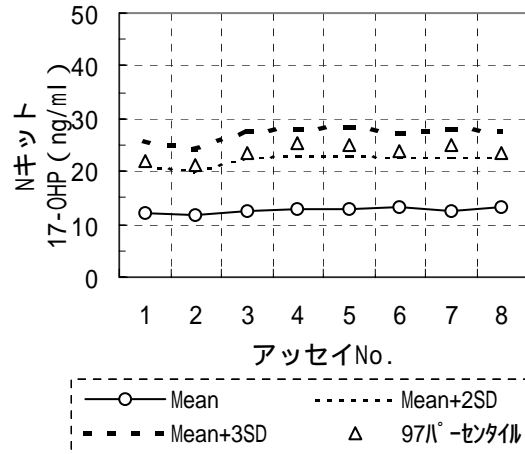


図-6.N キット 17-OHP 直接法の基本統計値

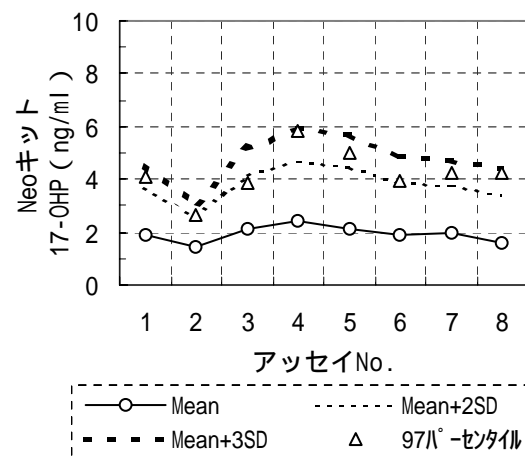


図-7.Neo キット 17-OHP 直接法の基本統計値

対して, Neo キットで Mean ± SD=2.06 ± 1.11ng/ml (n=1,232) と明らかに低値を示した。その他の基本統計値は, 図-6, 7 に示す。度数分布は, 図-8, 9 に示すとおり, N キットに比べて Neo キットの分布が大きく低値側にシフトしていた。

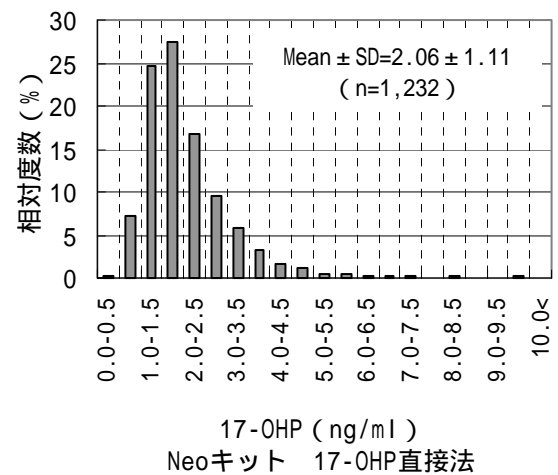


図-9.Neo キット 17-OHP 直接法の相対度数分布

### 3-2(2).濃度の相関(新生児検体)

NキットとNeoキットの17-OHP直接法による濃度の相関は,相関係数  $R=0.685$  ( $n=1,232$ )と必ずしも良好ではなかった(図-10)。17-OHP抽出法による濃度の相関は,互いに17-OHP直接法の各アッセイから選んだ高値検体についてであるが, $R=0.942$  ( $n=32$ )と良好であった(図-11)。

ELISA法による17-OHP値を評価するため,HPLC法による測定値を真値として比較したところ,17-OHP直接法との相関は,Nキットが $R=0.654$  ( $n=207$ ),Neoキットが $R=0.751$  ( $n=278$ )であった(図-12,13)。また,ELISA法で主な交差反応物質を前処理により除去可能な17-OHP抽出法による濃度の相関は,Nキットが $R=0.912$  ( $n=207$ ),Neoキットが $R=0.852$  ( $n=278$ )と,いずれも17-OHP直接法に比べて大きく改善されていた(図-14,15)。

### 3-2(3).濃度の相関(患者検体)

21-水酸化酵素欠損症患者の17-OHP値について,NeoキットとHPLC法でを比較したところ,17-OHP直接法については $R=0.986$  ( $n=9$ ),17-OHP抽出法では $R=0.981$  ( $n=9$ )といずれも良好な相関を示し,かつ回帰式の傾きがHPLC法対直接法で1.183,対抽出法で1.003とほぼ近い値を示すことから,治療管理中の患者についてはNeoキットによる測定で十分真値に近い結果が得られた(図-16,17)。

## 4. 考 察

17-OHP測定試薬は,使用する抗17-OHP抗体の種類により2つに大別される。一つは,17-OHPのC-3位カルボニル基にタンパクを結合した物質を免疫源として作成し,その抗体をベースに構成した3位キットである。バイエルメディカルのNキットが同様の手法で作成した抗体を使用しており,特徴はプロゲステロンに対する交差反応性が非常に低いことと,新生児の血中に大量に存在する17-OHP代謝物である水溶性の17-OHPpregnenolone-3-sulfateに対する交差反応性が非常に高いことである<sup>3)</sup>。も

う一つは,17-OHPのC-7位にタンパクを結合した免疫源から作成した抗体をベースに構成したもので,栄研化学の17-OHP D-ELISA'栄研',バイエルメディカルのエンザプレート N-17 -OHP-7,その改良抗体をベースとした最も新しいNeoキットらが7位キットと呼ばれている。特徴としては,プロゲステロンに対して若干の交差反応を起こすが,17-OHP硫酸抱合体に対しては交差反応性が非常に低く,3位キットに比べて測定値がかなり低く真値に近い。中でもエンザプレートNeoキットは,最も真値に近づいたキットで,十分な感度と再現性が証明されれば,キット(抗体)と測定方法の統一により,カットオフ値の統一と濃度評価の画一化が期待できる。今回の検討では,低濃度から高濃度までELISA法として十分な再現性があることが示された(図-5,表-1)。その一方で,17-OHP直接法では従来型のNキットと改良型のNeoキットとの濃度相関が意外に低く( $R=0.685$ , 図-10),NキットをNeoキットに変更する場合,直接法のみで陽性者を検出すると,再採血対象者が一致しなくなることが予想された(本稿では示さないが,Neoキットの直接法アッセイで選別される高値検体は,Nキットのそれと一致しないことが多い)。17-OHP抽出法では両キットの濃度相関が $R=0.942$  (図-11)と良好であることから,抽出法であれば,従来と同様な結果が得られることが示された。

ELISA法による測定値を評価する目的でHPLC法と比較したところ,17-OHP直接法ではNキットとNeoキットのいずれも十分な相関があるとは言えないが( $R=0.654, 0.751$ , 図-12,13),抽出法ではともに $R=0.9$ 前後(図-14,15)と十分な相関があることから,キットの変更を行っても陽性者の検出に問題が生じる可能性は低いと考えられる。さらに,治療・管理中の患者の17-OHP抽出法では,HPLC法と良い相関を示し真値にかなり近いことから,Neoキットは患者の経過観察にも有効であることが判明した(図-16,17)。

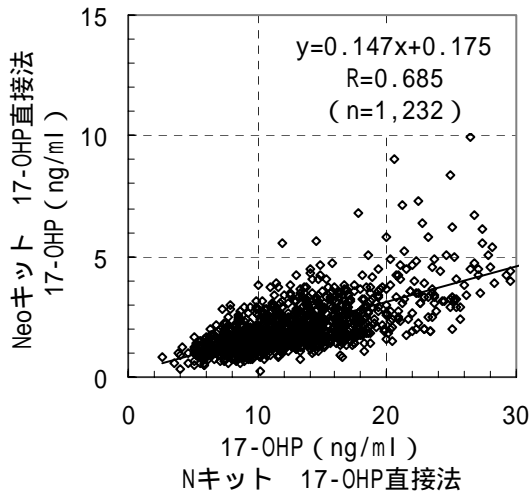


図-10.17-OHP 直接法の相関 (N 対 Neo)

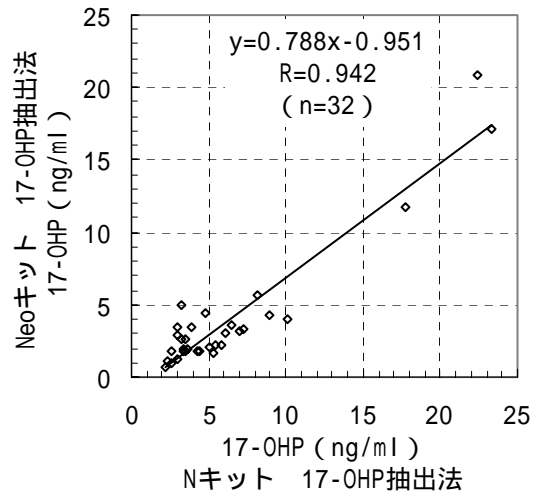


図-11.17-OHP 抽出法の相関 (N 対 Neo)

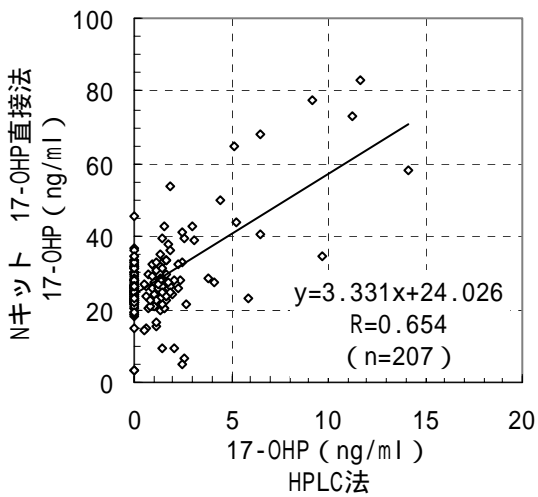


図-12.N キット 17-OHP 直接法と HPLC 法の相関

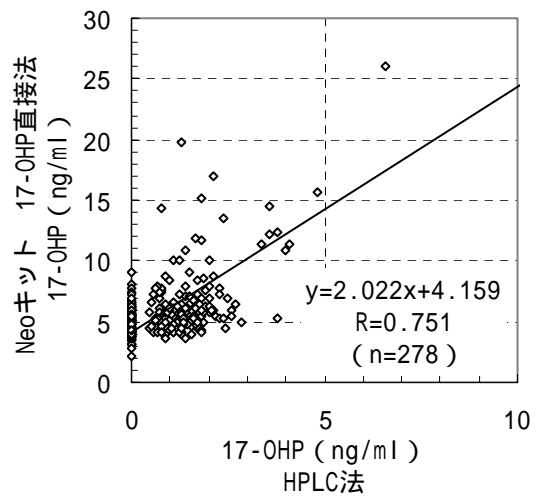


図-13.Neo キット 17-OHP 抽出法と HPLC 法の相関

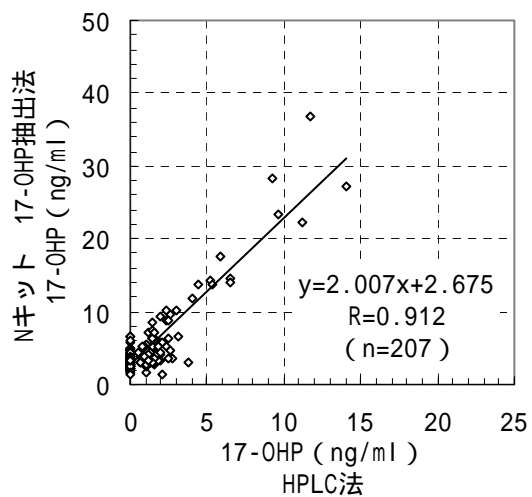


図-14.N キット 17-OHP 抽出法と HPLC 法の相関

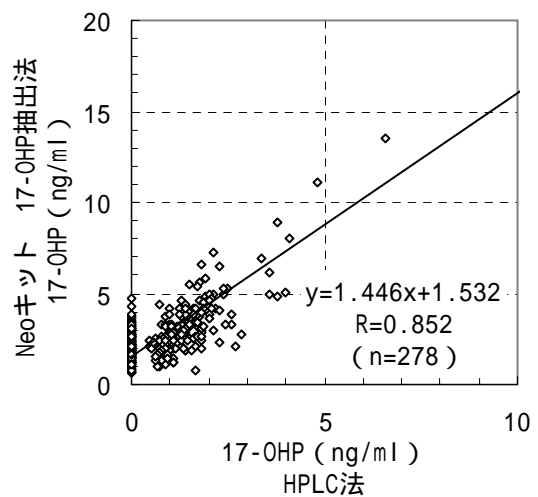


図-15.Neo キット 17-OHP 抽出法と HPLC 法の相関

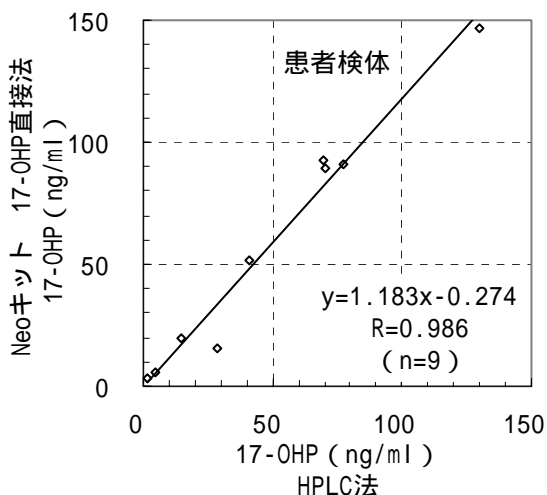


図-16. Neo キット 17-OHP 直接法と HPLC 法の相関

以上のことから、Neo キットによる CAH スクリーニングの改良には、一次検査として 17-OHP 直接法を行い、パラメトリックに選別した高値検体 (>97 パーセントイル) を対象に行う 17-OHP 抽出法で陽性者を検出する、二段階法で実施するのがよいと考えられた (図-18)。Neo キットによる 17-OHP 抽出法のカットオフ値は、従来の N キットによる 17-OHP 抽出法のカットオフ値 7.0ng/ml<sup>8)</sup> を Neo キット対 Neo キットの濃度相関回帰式 (図-11) に代入して得られた 4.6ng/ml を参考にして、4.5ng/ml とした。実際に、2002 年 4-9 月までに受け付けた新生児 8,614 例を対象として二段階法を行い、カットオフ値を 4.5 とした場合の陽性者は 32 例 (0.37%) と妥当な率であった。

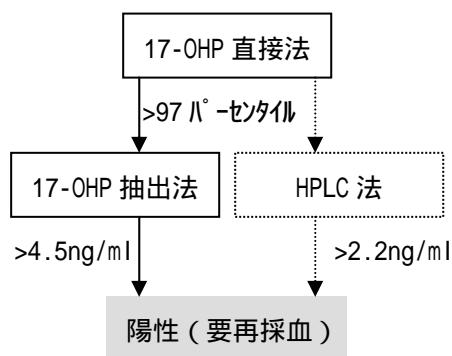


図-18. Neo キットによる新しい CAH スクリーニング

図-17. Neo キット 17-OHP 抽出法と HPLC 法の相関

一方、ほぼ真値が得られることでより高い信頼性が期待される HPLC 法についても、17-OHP 抽出法に代わって採用可能か検討した。すなわち、N キットによる 17-OHP 抽出法のカットオフ値 7.0ng/ml を、対 HPLC 法の相関回帰式 (図-14) に代入して得られた 2.2ng/ml を HPLC 法のカットオフ値とすると、陽性者は 22 例 (0.26%) で、より低く抑えられた。その 22 例の Neo キット 17-OHP 抽出法対 HPLC 法の濃度相関は、 $r=0.963$  ( $y=2.063x-1.027$ ,  $n=22$ ) と非常に良好であることから、17-OHP 抽出法に十分代わりうると思われる。

今後は、交差反応物質の影響以外にストレス等の別の理由で 17-OHP 自体が上昇する低体重児や、スクリーニング時期に正常範囲に含まれる可能性がある非古典型や遅発型の 21-水酸化酵素欠損症患者の測定値評価等について、基準値の設定も含めて、例数を積み重ねて検討する必要がある。同時に、HPLC 法をさらに高感度化し、短時間で多成分に対応できるように改良し、17-OHP 抽出法に代わって採用できるよう検討していきたい。

### 5. 結 語

CAH スクリーニング方法を改善するために、エンザプレート Neo-17-OHP の有効性について検討した。本法では従来法に比べ真値に近く信頼性のある

結果が得られ、陽性者検出のためのカットオフ値の設定も可能なことから、有効なスクリーニング法を構築できることが示された。今後は、判定の難しい低体重児や非古典型及び遅発型の21-水酸化酵素欠損症患者のデータ蓄積によるカットオフの再評価と、HPLC法の確立(17-OHP抽出法との入れ替え)に努め、CAHスクリーニングシステムの一層の改良を図っていきたい。

## 6. 文献

- 1) 税所純敬, 横田一郎, 藤枝憲二 他: 先天性副腎過形成症(21-水酸化酵素欠損症)新生児マス・スクリーニング陽性者の取り扱い基準. 日児誌, 103(6), 695-701, 1999.
- 2) Suwa S: Nationwide survey of neonatal mass-screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan. Screening, 3, 141-151, 1994.
- 3) 福士 勝, 荒井 修, 松浦信夫 他: 「エンザブレート 17-OHP マス・スクリーニング」による乾燥濾紙血液 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone 測定法の基礎的検討. ホルモンと臨床, 35(9), 89-94, 1987.
- 4) Maeda M, Yang KH and Tsuji A: Direct solid-phase time-resolved fluoroimmunoassay of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in dried blood spotted on filter paper. Analytical Sciences, 7, 699-702, 1999.
- 5) Larsson A, Hagenfeldt L, von Döbeln U et al: Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia using 17-hydroxyprogesterone assay in filter paper blood spots. Horm Res, 30, 235-240, 1988.
- 6) 神田武利, 大津 裕: セミマイクロカラム高速液体クロマトグラフィー(カラムスイッチング)を用いる紫外外部吸収検出器による唾液中コルチゾールおよびコルチゾンの同時定量. 臨床化学, 25, 165-170, 1996.
- 7) Mikami A, Fukushi M, Fujieda K, et al: Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo City: Sixteen years experience. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 30 (Supple.2), 100-102, 1999.
- 8) 諏訪瑛三 編: 先天性副腎過形成症マススクリーニング 21-水酸化酵素欠損症の検査から治療まで 実績報告1 札幌市. 93-122, 恩賜財団母子愛育会, 1990.



## A Trial to Improve the Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia - Basic Study on the Enzaplate Neo-17 $\alpha$ -OHP -

Atsushi Mikami, Kaori Honma, Yoshikiyo Mizushima, Tsuneichi Ozaki, Kozo Fujita

In order to improve the congenital adrenal hyperplasia (CAH) screening program, a newly developed ELISA kit [Enzaplate Neo-17 $\alpha$ -OHP based on a new highly selective anti-17-hydroxyprogesterone (17-OHP) antibody] was tested, and its efficacy was evaluated by a basic loading test and by comparing with the kit currently in use or the highly sensitive HPLC method. The data revealed that the new kit had an acceptable reproducibility (CV=11.28-14.14% in 17-OHP direct assay, CV=7.24-15.33% in 17-OHP extracting assay) between high and low levels of 17-OHP. The results showed, moreover, that 17-OHP levels measured by new kit were evaluated to be close to the values measured by HPLC (R=0.852 by correlation between 17-OHP extraction assay and HPLC in 278 neonates, R=0.981 in 9 patients with 21-hydroxylase deficiency). New kit is capable of setting a cut-off level (17-OHP>4.5ng/ml with the extracting assay) to detect positive cases. These facts show that the newly developed reagent is worth to use in CAH mass-screening.