先天性副腎皮質過形成 (21 - 水酸化酵素欠損症) の マス・スクリーニングに関する研究

第 4 報

マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液 Cortisol の酵素免疫測定法の開発と
新生児マス・スクリーニングへの応用

札幌市衛生研究所

福 士 勝, 荒 井 修
水 嶋 好 清, 高 杉 信 男

北海道大学医学部小児科

藤 枝 憲 二, 松 浦 信 夫

Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency

4. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Dried Blood Cortisol and Its Application to Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency

**Masaru FUKUSHI¹⁾, Osamu ARAI¹⁾, Yoshikiyo MIZUSHIMA¹⁾,
Nobuo TAKASUGI¹⁾, Kenji FUJIEDA²⁾ and Nobuo MATSUURA²⁾**

1) Sapporo City Institute of Public Health, Sapporo 064, Japan

2) Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060, Japan

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Cortisol in dried blood collected on filter paper has been developed. The ELISA method is very simple and rapid and has sensitivity, accuracy and precision. The detection limit of the ELISA is 10ng/ml blood. The intra- and interassay coefficients of variation are 11.5 ~ 13.5% and 15.7 ~ 16.7%, respectively.

Using the ELISA for Cortisol and 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) previously reported, dried blood from normal newborns including premature infants (n=1583) and 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) patient (n=9) were analyzed. 17-OHP, Cortisol and 17-OHP/Cortisol ratio of normal newborns are 12.5 ± 7.5 ng/ml (1.0 ~ 140 ng/ml), 89.0 ± 64.3 ng/ml (10 ~ 1580 ng/ml) and 0.16 ± 0.08 (0.01 ~ 0.86), respectively. In 21-OHD patients, 17-OHP is 109 ~ 1361 ng/ml, Cortisol is 35.1 ~ 146.7 ng/ml and 17-OHP/cortisol ratio is 1.84 ~ 12.2. It made recall rate less to measure Cortisol in addition to 17-OHP and to take

17-OHP/Cortisol ratio.

Therefore, additional measurement of Cortisol to the primary 17-OHP screening test is advantaged in differentiating the normal newborns from the 21-OHD patients.

I. 緒 言

先天性副腎皮質過形成 (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH) の大部分を占める21-水酸化酵素欠損症 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD) のスクリーニングの指標としては17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) が有用であり, その新生児マス・スクリーニング法として乾燥濾紙血液を用いる Radioimmunoassay (RIA)^{6) 10) 12) 13) 14) 17)} や Enzyme immunoassay (EIA)^{1) 4)} が開発され, 実際の新生児スクリーニングに応用されている^{2) 4) 10) 15)}。著者らも EIA⁴⁾ やマイクロプレートを用いる Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)⁵⁾ によるスクリーニング法を開発し, スクリーニングの有効性を報告してきた。

しかし, RIA^{2) 10) 15)}, EIA^{1) 4)} および ELISA⁵⁾ のいずれの方法を用いても, 未熟児やストレス下にある児では17-OHP値が高値となり疑陽性例が多く, スクリーニングされた家族の心理的, 経済的負担やスクリーニングの効率化等で問題があった。

そこで, 著者らはこのような疑陽性例を減少させる方法として, Cortisol のELISAを開発し, 同一濾紙血液での17-OHP値とCortisol値との比をとることで, CAH患児と正常児との鑑別が容易になるのではないかと考え検討を行ったので報告する。

II. 方 法

1. 対象

Cortisol のELISAの基礎的検討には正常新生児および正常成人の乾燥濾紙血液を用いた。

抗Cortisol血清の抗体の特異性の比較には正常新生児100例と21-OHD患児10例を, 日令4~7日の出生体重によるCortisol値および17-OHP/Cortisol比の比較には低出生体重児71例を含む1,258例の新生児濾紙血液を用いた。

また, 正常新生児と21-OHD児の17-OHP値, Cortisol値, 17-OHP/Cortisol比の比較には正常新生児1,583例と21-OHD患児9例(18検体)を用いた。

2. 試薬とその調製

1) 標準ステロイド

Cortisolおよび17-OHPの測定および交叉反応の検討に用いた標準ステロイドはSteraloids社およびSigma社のものを用いた。

2) 緩衝液

測定に用いた緩衝液は既報⁵⁾の17-OHPのELISAと同一であり, 第二抗体固相化プレートの作製ではリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.4), 抗原抗体反応ではPBSに0.1%ウシ血清アルブミン(Fr. V, Sigma社)を添加したPBS-BSA, 酵素反応には0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)をそれぞれ使用した。

3) 標準Cortisol濾紙血液

既報⁴⁾と同様にヘマトクリット50%のステロイドホルモンフリー血液を作製し, これにCortisol

標準溶液を全血1mlあたり10ngから1,000ngとなるように添加した。このCortisol標準血液を新生児スクリーニング用濾紙(東洋濾紙製)に50 μ lずつ滴下し、乾燥後使用時まで-20℃で保存した。

4) 抗Cortisol血清

抗Cortisol血清はCortisol-6-(o-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin (F-6-CMO-BSA)を抗原として家兎に免疫して作製されたもの(以下抗F-6-CMO-BSA血清)を千倍希釈して使用した。さらに、抗体の特異性によるCortisol値の比較のため、Cortisol-6-succinoyloxy-BSAおよびCortisol-21-hemisuccinate-BSAで作製された抗体として抗F-6-Succ-BSA血清および抗F-21-Hemi-BSA血清をそれぞれ10万倍および2万倍希釈で使用した。

5) 第二抗体固相化マイクロプレート

既報⁵⁾の17-OHP ELISAに使用したプレートと同様に作製した。

6) Cortisol-ペルオキシダーゼ結合体(Cortisol-HRP)

Cortisol-3-(o-carboxymethyl) oximeおよびCortisol-21-hemisuccinate (Steraloids 社)を用いて混合酸無水物法により Horseradish peroxidase (Type VI, Sigma 社製)を結合させた後、Sephadex G 100カラム(ϕ 1.6 $\times$ 100 cm)でゲル濾過を行い、酵素活性と免疫活性が一致する分画をPBS-BSAで5倍希釈して使用時まで-20℃で保存した。使用時にはいずれも最終5千から1万倍希釈した。

7) 酵素反应用基質および停止液

基質および停止液ともに既報⁵⁾の17-OHPのELISAと同一であり、基質は10mM 過酸化水素水、1.4 μ M o-phenylenediamineを使用時に調製し、等量を混合して用い、停止液は3N H₂SO₄を用いた。

3. 測定方法

1) CortisolのELISA

第二抗体固相化マイクロプレートの各ウェルに直径3mmの乾燥濾紙血液を打ち抜き、抗Cortisol血清0.1mlとCortisol-HRP溶液0.05mlを加えて攪拌し、25℃で2~24時間反応させた。これ以降のウェルの洗浄から基質の添加、反応停止、および吸光度の測定はすべて既報⁵⁾の17-OHPのELISAと同様に行った。

2) Cortisolの第二抗体固相化ビーズを用いるEIA

既報⁴⁾の17-OHPのと同様の方法により蛍光法で行った。すなわち、直径3mmの乾燥濾紙血液に抗Cortisol血清とCortisol-HRP溶液、第二抗体固相化ビーズを加えて一晩反応させ、生理食塩水でビーズを洗浄し、3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid-H₂O₂を基質として酵素活性を測定して標準Cortisolから濃度を求めた。

III. 結 果

1. CortisolのELISAの基礎的検討

1) 抗血清の特異性

本測定法に用いた抗F-6-CMO-BSA血清の各種ステロイドとの交叉反応をTable 1に示した。

11-deoxycortisolが26.8%, 21-deoxycortisolが11.4%, Cortisoneが10.0%, Corticosteroneが8.9%とやや高いものの、17-OHPは2.0%, Androstenedioneでは0.1%以下と低値であった。

Table 1. Cross reactivity of anti-Cortisol-6-(o-carboxymethyl) oxime bovine serum albumin conjugate serum.

Steroids	Cross reactivity(%)
Cortisol	100.0
Cortisone	10.0
11-deoxycortisol	26.8
21-deoxycortisol	11.4
17 α -hydroxyprogesterone	2.0
Corticosterone	8.9
11-deoxycorticosterone	< 0.1
Androstenedione	< 0.1
Testosterone	< 0.1
Progesterone	< 0.1

2) 標準曲線と Precision profile

乾燥濾紙血液3mmディスク1枚を用いたときのB/Boの90%点は10ng/ml blood, 50%点は50ng/ml bloodであった。Precision profileから求められた変動係数は10から500ng/ml bloodの濃度範囲で4%から15%であった (Fig.1)。

3) 再現性

Cortisol 濃度が115および200ng/mlの濾紙血液を同時に8回測定して得られた測定内変動係数はそれぞれ11.5%と13.6%であり, 10回の異なる測定で得られた測定間変動係数はそれぞれ15.7%と16.7%であった。

Fig. 1. Typical standard curve and within assay precision profile of the present ELISA method.

Fig. 2. Correlation between Cortisol values obtained by ELISA and those obtained by EIA.

4) 第二抗体固相化ビーズを用いる EIA との相関

70例の新生児濾紙血液の本法 (X) と第二抗体固相化ビーズを用いる蛍光法による EIA (Y) との相関係数は $r=0.887$ と有意な相関が認められ ($p<0.001$), 回帰式は $Y=0.723X+19.1$ となった (Fig.2)。

2. 新生児スクリーニングへの応用

1) 新生児 Cortisol 値の抗血清の違いによる変化

抗 Cortisol 血清として抗 F-6-CMO-BSA 血清, 抗 F-6-Succ-BSA 血清および抗 F-21-Hemi-BSA 血清の3種類を用いて測定した正常新生児100例と21-OHD 患児10例の Cortisol 値の平均値±標準偏差は正常新生児で $97.0 \pm 56.6 \text{ ng/ml}$, $124.3 \pm 77.4 \text{ ng/ml}$ および $153.9 \pm 236.7 \text{ ng/ml}$ であり, 患児では $99.0 \pm 44.1 \text{ ng/ml}$, $134.3 \pm 94.0 \text{ ng/ml}$ および $306.7 \pm 137.2 \text{ ng/ml}$ であった (Table 2)。同一抗血清間での Cortisol 値は F-21-Hemi-BSA 血清を用いた時に21-OHD 児で有意に高値を示した ($p<0.001$)。一方, 異なる抗血清間では F-6-CMO-BSA 血清が他の2種の抗血清と比較して有意に低値を示した ($p<0.001$)。

2) 新生児 17-OHP/Cortisol 比の抗血清の違いによる変化

抗 Cortisol 血清の違いによる 17-OHP/Cortisol 比の平均値±標準偏差は, 抗 F-6-CMO-BSA 血清, 抗 F-6-Succ-BSA 血清および抗 F-21-Hemi-BSA 血清でそれぞれ 0.16 ± 0.07 , 0.14 ± 0.10 および 0.13 ± 0.08 であり, 患児では 5.71 ± 5.25 , 5.89 ± 5.23 および 1.54 ± 0.77 であった (Table 3)。同一抗血清間では21-OHD 児が正常新生児と比較して有意に高値を示した。異なる抗血清間では, 正常新生児では 17-OHP/Cortisol 比に有意差が認められないが, 21-OHD 患児では抗 F-21-Hemi-BSA 血清で有意に低値を示した ($p<0.001$)。

Table 2. Cortisol concentration in 100 normal newborns and newborns with 21-hydroxylase deficiency measured by direct assay using three different anti Cortisol serum.

Antigen	Cortisol (ng/ml)		
	Cortisol-6CMO-BSA	Cortisol-6Succ-BSA	Cortisol-21Hemi-BSA
Normal Newborns (n=100)			
Mean $\pm$ SD	97.0 $\pm$ 56.6	124.3 $\pm$ 77.4*	153.9 $\pm$ 236.7*
Range	12.6 - 304.2	13.1 - 490.2	18.9 - 2352.3
Newborns with 21-OHD (n=10)			
Mean $\pm$ SD	99.0 $\pm$ 44.1	134.3 $\pm$ 94.0*	306.7 $\pm$ 137.2*,**
Range	34.9 - 160.0	8.8 - 348.0	147.9 - 532.5

* p<0.001 vs. Anti cortisol-6CMO-BSA serum.

** p<0.001 vs. normal newborns in same anti-serum.

Table 3. 17-OHP/Cortisol ratio in 100 normal newborns and newborns with 21-hydroxylase deficiency measured by direct assay using three different anti Cortisol serum.

Antigen	17-OHP/Cortisol ratio		
	Cortisol-6CMO-BSA	Cortisol-6Succ-BSA	Cortisol-21Hemi-BSA
Normal Newborns (n=100)			
Mean $\pm$ SD	0.16 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.08
Range	0.06 - 0.44	0.04 - 0.65	0.01 - 0.48
Newborns with 21-OHD (n=10)			
Mean $\pm$ SD	5.71 $\pm$ 5.25 *	5.89 $\pm$ 5.23 *	1.54 $\pm$ 0.77 *
Range	1.73 - 17.98	0.92 - 16.90	0.41 - 2.62

* p<0.001 vs. normal newborns in same anti-serum.

Table 4. The change of 17-OHP, Cortisol and 17-OHP/Cortisol ratio by birth weight at neonatal age.

Birth Weight (gr.)	n	17-OHP (ng/ml)	Cortisol (ng/ml)	17-OHP/Cortisol Ratio
1,000 - 1,499	4	16.1 $\pm$ 9.0* (9.7 - 29.0)**	107.0 $\pm$ 38.6 (62.5 - 144.6)	0.16 $\pm$ 0.08 (0.07 - 0.25)
1,500 - 1,999	12	16.1 $\pm$ 10.4 (4.2 - 38.8)	91.7 $\pm$ 38.1 (24.4 - 163.6)	0.18 $\pm$ 0.07 (0.05 - 0.34)
2,000 - 2,499	55	10.8 $\pm$ 6.1 (1.3 - 32.0)	99.6 $\pm$ 61.7 (19.9 - 304.1)	0.13 $\pm$ 0.06 (0.04 - 0.33)
2,500 -	1,187	9.2 $\pm$ 4.8 (1.3 - 44.0)	105.8 $\pm$ 76.7 (12.9 - 750.0)	0.09 $\pm$ 0.06 (0.02 - 0.48)

* Mean $\pm$ SD, ** Range

3) 新生児期の生下時体重と17-OHP値, Cortisol値および17-OHP/Cortisol比

日令4日から7日の新生児1,258例を生下時体重により1,000～1,499g群4例(第Ⅰ群), 1,500～1,999g群12例(第Ⅱ群), 2,000～2,499g群55例(第Ⅲ群), 2,500g以上群1,187例(第Ⅳ群)の4群に分類したときの各群における17-OHP値, Cortisol値および17-OHP/Cortisol比をTable4に示した。第Ⅰ群から第Ⅳ群までの17-OHP値の平均値±標準偏差はそれぞれ 16.1 ± 9.0 , 16.1 ± 10.4 , 10.8 ± 6.1 , 9.2 ± 4.8 ng/ml, Cortisol値はそれぞれ 107.0 ± 38.6 , 91.7 ± 38.1 , 99.6 ± 61.7 , 105.8 ± 76.7 ng/ml, 17-OHP/Cortisol比はそれぞれ 0.16 ± 0.08 , 0.18 ± 0.07 , 0.13 ± 0.06 , 0.09 ± 0.06 であった。17-OHP値は低出生体重群でより高値を示し, Cortisol値は体重による変化を認めなかった。一方, 17-OHP/Cortisol比は低出生体重群でやや高値を示すものの, 第Ⅰ群から第Ⅲ群までのレンジは第Ⅳ群のレンジ内にあった。

4) 正常新生児と患児の17-OHP値, Cortisol値, 17-OHP/Cortisol比の比較

未熟児を含む新生児1,583例の17-OHP値の平均値±標準偏差は 12.5 ± 7.5 ng/ml, レンジは1.0～140 ng/mlで, Cortisol値は 89.0 ± 64.3 ng/ml, レンジは10～1,580 ng/mlであり, 17-OHP/Cortisol比は 0.16 ± 0.08 , レンジは0.01～0.86であった。一方, 患児の17-OHP値は21-OHD患児9例中食塩喪失型6例14検体は全検体とも200 ng/ml以上であり, 単純男性化型3例は109～465 ng/mlであった。Cortisol値は9例17検体は $35.1 \sim 146.7$ ng/mlと正常範囲内にあった。17-OHP/Cortisol比は全検体とも1.85～17.98の範囲にあり正常新生児対照の分布とは異なっていた(Fig. 3)。

Fig. 3. 17-OHP, Cortisol and 17-OHP/Cortisol ratio in normal newborns and untreated newborns with 21-hydroxylase deficiency.

IV. 考 案

CAHの新生児マス・スクリーニングは乾燥濾紙血液中の17-OHPを指標としてRIA²⁾¹⁰⁾¹⁵⁾やEIA⁴⁾により行われてきた。本邦における本症の発生頻度は9,000人から14,000人に1人⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾と高く, 欧米²⁾¹¹⁾での報告とほぼ一致しており, 早期発見による治療効果も大きいことから¹⁸⁾, 行政レベルでのマス・スクリーニングの実施が望まれている。

著者らは1982年から札幌市における新生児マス・スクリーニングの一環として本症のスクリーニングを実施してきた⁴⁾。その中での問題点として、

- ①乾燥濾紙血液検体に直接抗17-OHP血清と酵素標識17-OHPを加えて測定を行う直接法EIAは簡便であるが17-OHP高値を示す例が多く、疑陽性率が1.5%以上と高いこと、
- ②乾燥濾紙血液検体から17-OHPを溶出させてジエチルエーテルで抽出後測定を行う抽出法では疑陽性率が1%以下に減少するが、操作が複雑で、環境衛生上好ましくないこと、
- ③直接法、抽出法いずれを用いてもストレス下にある児では17-OHP高値となり、特に未熟児や低出生体重児ではその傾向が強く、全疑陽性の1/2以上を占め、その頻度は正常満期産児の20倍以上となることが判明した。

直接法で17-OHP高値となるのは、新生児期に高値を示すとされる水溶性の17 α -hydroxypregnenolone-3-sulfate (17-OH Δ^5 P-S)との交叉反応による干渉が大きく関与しているものと考えられており、より特異性の高い抗血清の作製により解決できる。しかし、現在使用中の抗血清よりも特異性の高いものが入手できない現状では、17-OH Δ^5 P-Sの干渉を除くには抽出法がより有用である。一方、抽出法においても21-OHD患児以外で17-OHP高値となる原因は、ジエチルエーテル抽出で除去できない17 α -hydroxypregnenoloneやprogesterone等との交叉反応も考えられるが、感染症やその他の疾患によるストレス等により17-OHPそのものが増加している可能性も考えられる。特に低出生体重児で17-OHP高値となる頻度が高いのは、正常満期産児と比較して新生児呼吸窮迫症候群や感染症などのストレス下にある症例が多いことによるためと考えられる。この点に関しては諏訪ら¹⁹⁾も合併症のない低出生体重児では正常満期産児と比較して17-OHPおよび17-OH Δ^5 P-Sが高値をとらないことを示し、スクリーニングでの17-OHP高値の原因を合併症やその他のストレスによる17-OHPの増加によるものと報告している。著者らも実際のスクリーニングにおいて感染症を合併した正常満期産児で17-OHP値が50 ng/ml以上と21-OHD患児以上のレベルを示す症例を経験している。さらに低出生体重児では17-OHP値の分布の平均値は正常満期産児よりも高値を示しているが、その分布の範囲はTable 4に示したように、低出生体重児よりも正常満期産児で高値側に広く分布していることから、低出生体重児について別にカットオフ値を設定することにより疑陽性率を減少させるのは、見逃しの点で問題があると思われる。

そこで、21-OHD患児では17-OHPの増加、Cortisolの低下があり、ストレス下にある新生児では17-OHPの増加とともにCortisolも増加することから、17-OHP/Cortisol比を用いることにより、両者間の差が大きくなり、カットオフ値の設定や鑑別が容易になるものと考えられる。実際に、未熟児を含む1,583例の新生児と21-OHD児の17-OHP値の分布は重なっているが、17-OHP/Cortisol比の分布は完全に分れている。17-OHP単独測定によるスクリーニングでのカットオフ値を平均値+3SDと仮定すると、疑陽性率は0.95%と高くなるが、一方17-OHP/Cortisol比ではカットオフ値を平均値+2.5SDとしても疑陽性率は0.25%と約1/4に減少する。このことから17-OHP/Cortisol比による判定はCAHスクリーニングに有用であることが認められる。従って17-OHPのELISA⁵⁾で17-OHP高値例についてCortisolを測定するシステムにより、より迅速で精度の高いスクリーニングが可能となるものと考ええる。

さらに、著者らが開発したマイクロプレートを用いるCortisolのELISAは乾燥濾紙血液3 mmディスク1枚で、既報⁵⁾の17-OHPのELISAと同一の第二抗体固相化プレートを用いて、簡便で迅速な測定が可能であり、測定感度、再現性はいずれも従来報告されている血清を用いるEIA^{3) 7) 8) 9)}

と比較しても同等であることから、マス・スクリーニングの検査法としての条件も備えている。しかし、本システムをCAHの新生児マス・スクリーニングに応用する場合には、使用する抗Cortisol血清の特異性が問題となる。すなわち、21-OHD患児では17-OHP、21-deoxycortisol、 Δ^4 Androstenedione等が増加していることから、これらのステロイドと交叉反応が高い抗血清で測定すると、Cortisolが真の値よりも高値に測定され、17-OHP/Cortisol比が低値となり正常と判定される可能性がある。従って抗Cortisol血清の特異性、特に21-OHDで増加するステロイドとの交叉反応が低いことを確認しておく必要がある。

V. 結 語

- 1) マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液CortisolのELISAを開発した。
- 2) 本法は簡便で迅速な測定が可能であり、測定感度の点でもマス・スクリーニングの検査法として満足できるものであった。
- 3) マイクロプレートを用いる17-OHPの直接法による測定で17-OHP高値例については、本法によりCortisolを測定し17-OHP/Cortisol比を算出することで、疑陽性率を0.25%と従来の $\frac{1}{4}$ にまで減少させることができる。

以上のことより、17-OHP/Cortisol比を用いれば21-OHD児の特異的なスクリーニングが可能である。

稿を終えるにあたり、抗Cortisol血清を恵与していただきました帝京大学医学部 神戸川 明先生に深謝いたします。

本研究の一部は第13回代謝異常スクリーニング研究会(1985, 札幌)第59回日本内分泌学会(1986, 仙台)で発表した。本研究の一部は厚生省心身障害研究、マス・スクリーニングに関する研究班の研究費によった。

文 献

- 1) Arakawa, H., Maeda, A., Tsuji, A., Naruse, H., Suzuki, E. and Kambegawa, A.: Fluorescence enzyme immunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood samples on filter paper and its application to mass screening for congenital adrenal hyperplasia. *Chem. Pharm. Bull.*, 31: 2724-2731, 1983.
- 2) Cacciari, E., Balsamo, A., Cassio, A., Piazzzi, S., Bernardi, F., Salardi, S., Cicognani, A., Pirazzoli, P., Zappulla, F., Capelli, M. and Paolini, M.: Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch. Dis. Child.*, 58: 803-806, 1983.
- 3) Comoglio, S. and Celada, F.: An immuno-enzymatic assay of cortisol using *E. coli* β -galactosidase as label. *J. Immuno. Methods*, 10: 161-170, 1976.
- 4) 福士 勝, 荒井 修, 水嶋好清, 高杉信男, 藤枝憲二, 松浦信夫: 先天性副腎皮質過形成(21-水酸化酵素欠損症)のマス・スクリーニングに関する研究, 第1報: 乾燥濾紙血液17 α -hydroxyprogesteroneの酵素免疫測定法の基礎的検討と新生児マス・スクリーニングへの応用, 日内分泌会誌, 62: 683-696, 1986.
- 5) 福士 勝, 荒井 修, 水嶋好清, 高杉信男, 藤枝憲二, 松浦信夫: 先天性副腎皮質過形成(21-水酸化酵素欠損症)のマス・スクリーニングに関する研究, 第3報: マイクロプレートを用いる乾燥濾紙血液17 α -hydroxyprogesteroneの酵素免疫測定法の開発, 日内分泌会誌, 63:113-122,

1987. 6) Hofman, L.F., Klaniecki, J.E. and Smith, E.K.: Direct solid-phase radioimmunoassay for screening 17α -hydroxyprogesterone in whole-blood sample from newborns. *Clin. Chem.*, 31: 1127-1130, 1985. 7) Kobayashi, Y., Ogihara, T., Amitani, K., Watanabe, F., Kiguchi, T., Ninomiya, I. and Kumahara, Y.: Enzyme immunoassay for cortisol in serum using cortisol 21-amine. *Steroids*, 32: 137-144, 1978.
- 8) Lewis, J.G. and Elder, P.A.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol. *J. Steroid Biochem.*, 22: 673-676, 1985. 9) Ogihara, Y., Miyai, K., Nishi, K., Ishibashi, K. and Kumahara, Y.: Enzyme-labelled immunoassay for plasma cortisol. *J. Endocrinol. Metab.*, 44: 91-95, 1975. 10) Pang, S., Hotchkiss, J., Drash, A.L., Levine, L.S. and New, M.I.: Microfilter paper method for 17α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 1003-1008, 1977.
- 11) Pang, S., Murphey, W., Levine, L.S., Spence, D.A., Leon, A., LaFranchi, S., Surve, A.S. and New, M.I.: A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 413-420, 1982. 12) Piazzzi, S., Capelli, M., Paolini, M., Perugini, D., Grossi, G., Balsamo, A., Salomoni, P., Cassio, A., Bugirardini, G. and Cacciari, E.: Neonatal screening for 21-hydroxylase deficiency; a microfilter paper method 17α -hydroxyprogesterone assay. *J. Endocrinol. Invest.*, 5: 87-90, 1982.
- 13) Riordan, F.A.I., Wood, P.J., Wakelin, K., Betts, P. and Clayton, B.E.: Bloodspot 17α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia and home monitoring of corticosteroid replacement therapy. *Lancet*, 1: 708-711, 1984.
- 14) 下澤和彦: 先天性副腎皮質過形成(21-水酸化酵素欠損症)の新生児マス・スクリーニングに関する研究, 第一編, 乾燥濾紙血液による血中 17α -hydroxyprogesteroneの測定, 日内分泌会誌, 59: 1845-1859, 1983. 15) 下澤和彦: 先天性副腎皮質過形成(21-水酸化酵素欠損症)の新生児マス・スクリーニングに関する研究, 第二編, 静岡県西部地区におけるパイロットスタディ, 日内分泌会誌, 59: 1860-1873, 1983. 16) 下澤和彦, 矢田純一, 北川照男, 松浦幹夫, 村田光範, 土屋裕, 山内邦昭: 東京都における先天性副腎皮質過形成症の試験的マス・スクリーニング—昭和59年1月からの1年間の成績—. 日本小児科学会雑誌, 89: 2678-2685, 1985. 17) Solyom, J., Hammond, G.L. and Vihko, R.: A method for identification and follow-up of patients with a steroid-21-hydroxylase deficiency. *Clin. Chim. Acta*, 92: 117-124, 1979.
- 18) 諏訪城三: 新しいマス・スクリーニングの開発に関する研究, 厚生省心身障害研究, マス・スクリーニングに関する研究, 昭和59年度研究報告書, 239-245, 1985. 19) 諏訪城三, 立花克彦, 勝又規行, 前坂機江: 正常新生児および低出生体重児の血清 $17\text{ OH-Progesterone}$ と $17\text{ OH-Pregnenolone sulfate}$ —CAHマス・スクリーニングへ向けての検討—. 厚生省心身障害研究, マス・スクリーニングに関する研究, 昭和59年度研究報告書, 255-257, 1985. (受付日: '86. 7. 25)