

# 21-水酸化酵素欠損症 (21-OHD) の新生児 における内因性 $\Delta^4$ -ステロイドの動態

— より簡便化された高速液体クロマトグラフィーによる分析 —

矢田 純一, 税所 純敬, 下沢 和彦  
(東京医科歯科大学医学部小児科)

## 研究目的

前年度の報告書で HPLC により, 同一検体中の各種内因性  $\Delta^4$ -ステロイドの一斉分析とマス・スクリーニング陽性者の診断への応用について述べたが, 今回この方法に若干の改良を加え簡便化するとともに CAH 患児での Hydrocortisone による治療前後における cortisone (E), hydrocortisone (F),  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP), 21-deoxycortisol (21-DOF),  $\Delta^4$ -androstenedione ( $\Delta^4$ -A) などの  $\Delta^4$ -ステロイドの動態を明らかにし, さらにいまだ研究の十分でない 21-deoxycortisone (21-DOE) の血中濃度について検討することを目的とした。

## 研究方法

**1.対象症例:** 対象は21-OHD 患児3例である。T.O. は外性器の男性化及び色素沈着の精査のために入院した食塩喪失型の女児であり, T.I., K. S. は各々東京都におけるマス・スクリーニングにより発見された症例であり, T. I. は単純男性化型の女児, K. S. は食塩喪失型の女児である。

**2.試薬, HPLC 条件:** 前回の報告書と同じとした。

**3.前処理法:** Extrelut 1 (Merk 社製) による血清の前処理を図1に示した。血清 0.2 ml を測定に用いる方法を示したが, まず血清 0.25 ml に内部標準 dexamethasone (DXM) 50 ng と水を加え総量 1.25 ml とし, そのうちの 1.0 ml を Extrelut 1 に15分間保持させ, 酢酸エチル 4.5 ml で2回抽出し, 酢酸エチルを減圧乾固した後残渣に移動相液 30~40  $\mu$ l を加え溶解後その 20  $\mu$ l を HPLC-UV spectrophotometry で分析した。

## 研究結果

**1.Extrelut カラムによる回収率:** 表1に正常人血清を charcoal 処理し steroid free とした血清に各種ステロイドを加えた時の各ステロイドの回収率と, DXM のピーク高さを1とした時の各ステロイドのピーク高さの比を示した。回収率では, Eが 76.6  $\pm$  2.7 % と若干低い傾向があったが, その他は平均で80%以上と良好であり CV % も多くは5%以下と安定していた。血中ステロイド濃度の算定は Peak ratio を用い, 前回の報告と同様とした。

**2.治療前後における chromatogram の変化:** 図2に T. I. の chromatogram を示したが, 図

の右より日齢12, 20 (治療直前), 治療(Hydrocortisone 100 mg/m<sup>2</sup>/day 経口投与)後1週目のものである。治療前の2つの chromatogram を比較するとE, Fは低値を持続し, 日齢が進むにつれ21-DOF, 21-DOE, 17-OHPのピークが高くなり日齢20では21-DOF 37.5 ng/ml, 21-DOE 41.7 ng/mlと高値を示した。治療後は, 服薬後2時間であるがE, Fのピークは低いものの, 21-DOF, 21-DOEのピークは消失し, 17-OHPのピークも極めて小さくなっていった。

図3の chromatogram も右2つが治療前(日齢6日, 12日)であり, 左がHydrocortisone 100 mg/m<sup>2</sup>/dayによる治療4日後のものである。日齢6日でE 65.4 ng/mlとピークは高く認められたがFは8.0 ng/mlと低く, 21-DOF, 21-DOE, Δ<sup>4</sup>-A, 17-OHPのピークが認められた。日齢12日ではEのピークは低くなりFも僅かに認められるのみとなったが, 17-OHPを初めとして他の異常ピークはより高く認められるようになった。これらの異常ピークはHydrocortisoneの投与によりE, Fのピークが高くなるに従い消失した。

T. O. の治療前の chromatogram を図4に示した。右が6日, 左が8日(治療直前)であるが, E, Fのピークは低く, 治療直前ではFはほとんど認められなかった。また21-DOF, 21-DOE, 17-OHPは日齢8で増加傾向を示しΔ<sup>4</sup>-Aのピークも出現した。図5に治療経過中の chromatogram を示すが, 右はHydrocortisoneを100 mg/m<sup>2</sup>/day投与後50 mg/m<sup>2</sup>/dayまで減量し食塩喪失症状が出現した際のものであり, 中央は80 mg/m<sup>2</sup>/dayの時, 左は65 mg/m<sup>2</sup>/day投与で17-OHPが抑制された時の chromatogram である。E, Fのピークが低い時は17-OHPなどのピークは高値を持続し, 左の chromatogram のようにE (23.6 ng/ml), F (49.6 ng/ml)のピークが明瞭に認められるようになって初めて他の異常ステロイドのピークが消失した。

### 考案ならびに結語

HPLCの前処理法にExtrelut 1カラムを使用することにより, Dichloromethane抽出の際に生じる emulsion による回収率のばらつきが低下し, 安定した測定値を得ることができた。今回の方法での測定感度はPeak ratioの高いE, Fは約5 ng/ml (1 ng/sample)であり, 17-OHPは7.5 ~ 10.0 ng/ml (1.5 ~ 2 ng/sample)であった。

3症例の治療前後における各種Δ<sup>4</sup>-ステロイドの測定値をまとめて表2に示した。治療前のE, Fの濃度は低く, 新生児におけるFよりEへの代謝亢進を反映してEがFに比して高値であった。また症例数がすくなく有意検定はできないが, 食塩喪失型の患児でFはより低い傾向が認められた。また治療前における17-OHP, 21-DOF, 21-DOEの変動を見ると日齢が進むにつれ増加傾向を示しことに17-OHP, 21-DOEの増加が顕著で, 新生児期の未治療CAH患児ではEとFにおける代謝と同様のことが21-DOFと21-DOEその間に起こっていることが示唆された。一方, 治療後における各症例での測定値は, Hydrocortisone 80 ~ 100 mg/m<sup>2</sup>/dayの大量投与でも17-OHPが抑制されない症例があり, このような症例ではE,

F濃度は正常域にまで上昇していた。

以上のように、21-OHDの新生児期でのステロイド代謝異常の分析に少量の血清で多くのステロイドの測定が可能なHPLCを応用することはきわめて有効であった。今回検討し得た早期新生児期に発見され治療された21-OHD患児のE、F濃度はことにFにおいて極めて低値であること、17-OHP、21-DOF、21-DOE、 $\Delta^4$ -Aなどの異常ステロイド濃度には生後の増加傾向があることならびにそれらが治療によるE、F濃度の上昇に伴って低下する過程が、HPLCにより容易に確認された。

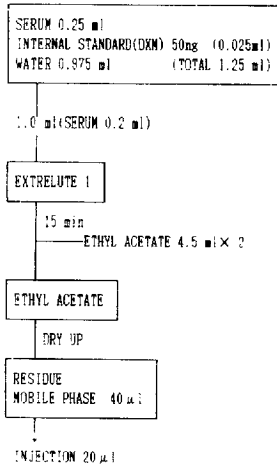


図1. 簡易カラム法による測定法

表1. 各種ステロイドの回収率とDXMのピーク高さに対する比

STERIODS		RECOVERY(%)	CV(%)	PEAK RATIO	CV(%)
ACETOSTERONE	(ALDO)	85.3±0.5	4.1	1.46±0.08	5.4
CORTISONE	(E)	76.8±0.7	2.5	1.89±0.02	1.2
HYDROCORTISONE	(F)	86.9±0.1	2.8	1.75±0.03	1.7
11 $\beta$ -OH- $\Delta^4$ -ANDROSTENEDIONE	(11 $\beta$ -OH- $\Delta^4$ -A)	92.1±0.6	0.7	2.55±0.04	1.6
21-DEOXYCORTISOL	(21-DOF)	84.5±0.7	2.8	3.55±0.13	3.7
21-DEOXYCORTISONE	(21-DOE)	85.6±0.3	2.7	1.17±0.03	2.6
DEXAMETHAZONE	(DXM)	82.2±0.9	3.5	-	-
DEOXYCORTISOL	(D)	84.5±1.3	2.5	1.15±0.02	1.7
$\Delta^4$ -ANDROSTENEDIONE	( $\Delta^4$ -A)	90.9±1.8	1.9	1.35±0.04	2.9
TESTOSTERONE	(T)	80.0±2.3	2.8	0.68±0.02	2.9
PROGESTERONE	(P)	85.5±1.8	1.9	0.32±0.02	2.2
17 $\alpha$ -OH-PROGESTERONE	(17 $\alpha$ -OH-P)	85.9±2.0	2.3	0.78±0.03	3.8
17 $\alpha$ -H-PROGESTERONE	(17 $\alpha$ -H-P)	86.5±2.2	2.2	0.79±0.03	2.9
$\Delta^4$ -PREGNENE	(17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -DIOL-3-ONE)	87.2±5.5	4.4	3.59±0.04	6.9
ANDROSTENEDIONE	(A)	87.1±5.7	4.5	1.59±0.05	4.5

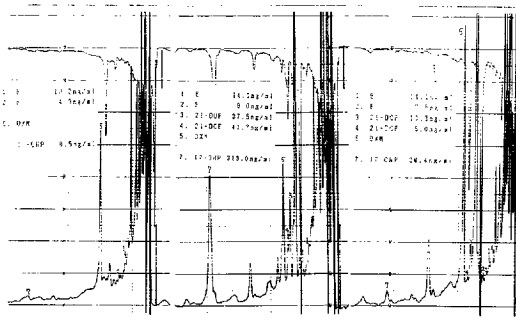


図2. ハイドロコーチゾンによる治療前後のクロマトグラムの変化 (T. I.)

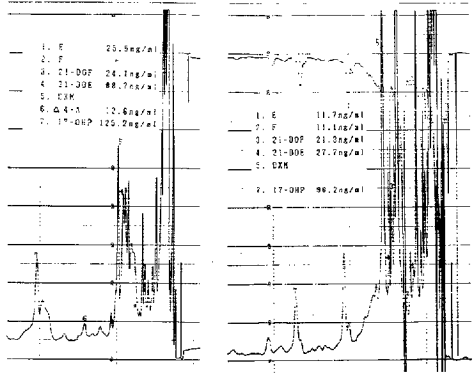


図4. 治療前のクロマトグラムの変化 (T. O.)

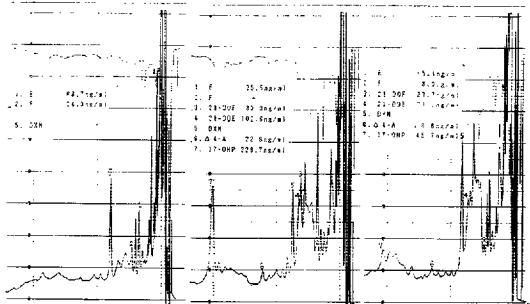


図3. ハイドロコーチゾンによる治療前後のクロマトグラムの変化 (K. S.)

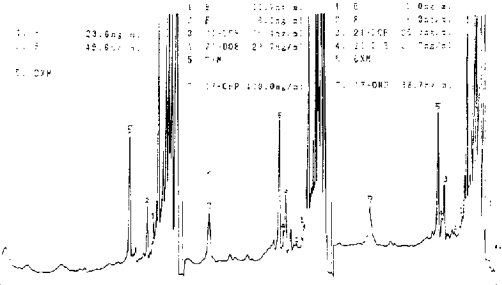


図5. ハイドロコーチゾンによる治療中のクロマトグラムの変化 (T. O.)

表2. 各ステロイドの測定値

症例	剤量(H.C.)	E	F	17-OHP	21-DOF	21-DOE	Δ4-A
T. I.	前	14.1	7.5	26.4	10.3	5.0	-
	前	14.0	9.0	319.0	37.5	41.7	-
	後(100)	13.2	4.9	8.5	-	-	-
K. S.	前	65.4	8.0	45.7	39.9	70.1	8.8
	前	25.8	+	329.7	39.9	102.6	22.8
	後(100)	68.7	24.9	-	-	-	-
T. O.	前	11.7	11.1	96.2	21.3	27.7	-
	前	25.5	+	125.2	24.1	88.7	12.6
	後(50)	12.0	6.3	88.7	25.0	29.7	-
	後(80)	11.7	6.1	108.0	25.4	24.4	-
	後(65)	23.6	49.6	-	-	-	-

H. C. : HYDROCORTISONE (mg/day), ng/ml



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)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



### 研究目的

前年度の報告書でHPLCにより,同一検体中の各種内因性 4-ステロイドの一斉分析とマス・スクリーニング陽性者の診断への応用について述べたが,今回この方法に若干の改良を加え簡便化するとともにCAH患児でのHydrocortisoneによる治療前後におけるcortisone(E),hydrocortisone(F),17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone(17-OHP),21-deoxycortisol(21-DOF),4-androstenedione(4-A)などの4-ステロイドの動態を明らかにし,さらにいまだ研究の十分でない21-deoxycortisone(21-DOE)の血中濃度について検討することを目的とした。