

# 血中 $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxypregn-4-en-3-one の RIA 法について

神戸川 明  
(帝京大・産婦)

## 【研究目的】

21水酸化酵素欠損児は  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ -OHP) が高値になるが、同時に高値を示すものとして  $21$ -deoxycortisol と  $17\alpha$ -hydroxypregnenolone sulfate が報告されている。<sup>1)2)</sup> 我々は  $17\alpha$ -OHP が体内で高くなると代償的に  $20$ 位のケトンが還元された  $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxypregn-4-en-3-one ( $17\alpha, 20\alpha$ -P) が高値になるのではないかと考え、このステロイドの Radioimmunoassay を開発し、これが  $17\alpha$ -OHP とどのような関係にあるかを検討したので報告する。

## 【研究方法】

### 1. $17\alpha, 20\alpha$ -P の抗血清の作製

$17\alpha, 20\alpha$ -P を carboxymethoxylamine と反応させて  $17\alpha, 20\alpha$ -P-3 (mix) carboxymethyl oxime にして、これを mixed anhydride 法で牛血清アルブミンを結合させ、透折後、凍乾して  $17\alpha, 20\alpha$ -P-3 (mix) CMO-BSA を作成し、これを抗原とした(図1)。これを Freund's adjuvant で乳化し、毎日免疫して4月目に採血して抗血清とした。

### 2. $^3\text{H}$ 標識 $17\alpha, 20\alpha$ -P の生合成

市販がないため、 $17\alpha$ -OHP-1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$  (55 Ci/mM) を Tris buffer 0.1 ml に溶かし、これに幼若ラットを PMS と hCG で排卵させた後の卵巣黄体の上澄 105,000  $\mu$  と incubation してできた  $17\alpha, 20\alpha$ -P-1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$  を TLC で精製して作った図2。

### 3. 血清からの抽出、分画および RIA 法

血清 0.5 ml に 500 ng/100  $\mu$  l の dexamethasone (Dex) を加え、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5 ml と振盪抽出した後、溶媒層をとり乾固しアセトニトリル 50  $\mu$  l にとかす。この液を HPLC (カラム ODS 4.6  $\times$  250 mm, アセトニトリル:水 = 55:45) の injection loop 20  $\mu$  l に注入し、 $17\alpha, 20\alpha$ -P と  $17\alpha$ -OHP の溶出部分をフラクションコレクターでとり、これに各々の  $^3\text{H}$  標識物 8000 dpm を加え真空乾固後、各々の抗血清 250  $\mu$  l を加え 30 分 incubate し、これに飽和硫酸溶液 250  $\mu$  l を加えて遠沈後の上層 250  $\mu$  l をカウントし、その結合率から血清 1 ml 中の  $17\alpha, 20\alpha$ -P と  $17\alpha$ -OHP 値を計算し、この値を初めに加えた Dex の HPLC のピーク面積で補正した。

## 【研究結果】

### 1. $17\alpha, 20\alpha$ -P 抗血清の特性

4ヶ月免疫して得た抗血清は 100,000 倍希釈で図3の如き標準曲線が得られ、 $17\alpha, 20\alpha$ -P- $^3\text{H}$  の結合を 50% 置換する量は  $96 \pm 14$  pM で感度 5 pM であり、他のステロイドとの交叉反応を表1

に示す。交叉反応率が高いステロイドは $17\alpha, 20\alpha\text{-P}_5$  が42%,  $17\alpha\text{-OHP}$  2.4% でその他は1%以下と抗血清の特異性が高かった。

## 2. 血清からの抽出分画とRIA法

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  抽出による回収率は $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$   $92.4\pm 2.7\%$ ,  $17\alpha\text{-OHP}$   $93.2\pm 3.5\%$ であった。

Sephadex LH-20のクロマトでは $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ と $17\alpha\text{-OHP}$ が溶媒系を種々検討したが、分離不能であった(図4)。HPLCではアセトニトリル:水の比を55:45にすると $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ と $17\alpha, 20\alpha\text{-P}_5$ とがよく分離できた(図5)。 $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ を血清に添加してHPLCにより分離し、RIAで測ったときの回収率は91~93%であり、実験内変動8.2%, 実験間変動11.5%であった。

## 3. 測定値

正常妊娠の母体血および分娩後の母体血と新生児の血中ステロイドの推移は図6の如く妊娠の進行にともなって $17\alpha\text{-OHP}$ は増強するが、 $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ は大体、 $17\alpha\text{-OHP}$ の1/10~1/20の値であり、妊娠中期に一時低下の傾向がみられた、また分娩後は $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ と $17\alpha\text{-OHP}$ は母体血と新生児血ともに経日的に減少した。表2。

### 【考按】

妊娠によって増加する $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ のOriginは胎児副腎で作られる $17\alpha\text{-OHP}_5$ が胎盤中の $3\beta\text{-HSD}$ と $20\alpha\text{-HSD}$ で $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ になることをin vitroで証明した<sup>3)</sup>。それゆえ娩出後は母児ともに低下するが、 $17\alpha\text{-OHP}$ よりも1/10以下と少ないことから、児がCAHであっても本ステロイドはマススリーニングに使うことはできないものと考えられた。

### 【文献】

- 1) 斉藤喜親, 丹羽利広, 吉田 久, 神戸川明: 先天性副腎過形成における血中 $17\alpha\text{-OHP}$ ,  $21\text{-deoxycortisol}$ , cortisol値について, ホルモンと臨床, 25 981~988, 1977。
- 2) 下沢和彦, 税所純敬, 矢田純一, 神戸川明: 小児期における血中 $17\alpha\text{-OH pregnenolone}$ および $17\alpha\text{-OH pregnenolone sulfate}$ 濃度の年令的推移, 日内分誌 61, 785~793, 1985。
- 3) 佐藤和宏, 神戸川明, 荒井 清:  $17\alpha, 20\alpha\text{-dihydroxy-4-pregnen-3-one}$ の妊娠中毒症の血中動態と分泌源について: 日産婦総会発表予定(1986)。

表1.  $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ の抗血清の交叉反応率

Steroids*	50% intercept	cross React %
$17\alpha, 20\alpha\text{-P}$	0.096ng	100 %
$17\alpha, 20\alpha\text{-P}_5$	0.23	42 %
$17\alpha\text{-OHP}$	4.0	2.4%
$20\alpha\text{-OHP}$	10.0	0.96%
$17\alpha, 20\beta\text{-P}$	20.0	0.48%
pregnanetriol	22.5	0.42%
progesterone	54.0	0.17%
$17\alpha\text{-OHP}_5$	78.0	0.12%
deoxycortisol	96.0	0.10%
pregnenolone	140.0	0.07%
cortisol	200.0	0.05%

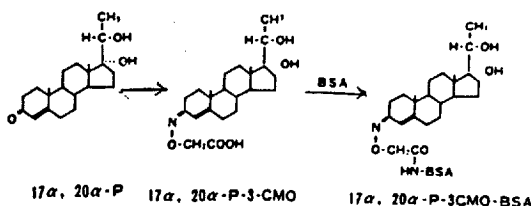


図1.  $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ の抗体作製用抗原の合成法

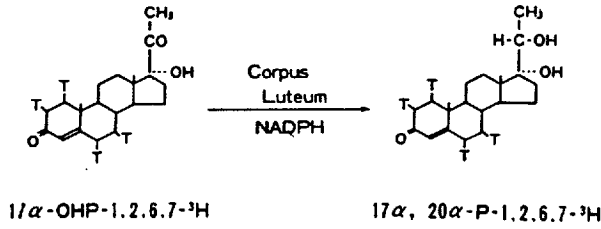


図2.  $^3\text{H}$ 標識  $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ の合成法

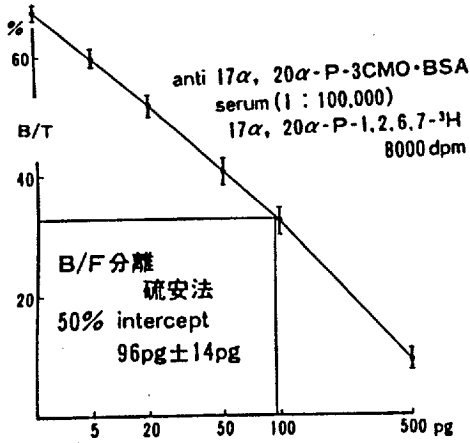


図3.  $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ のRIAによる標準曲線

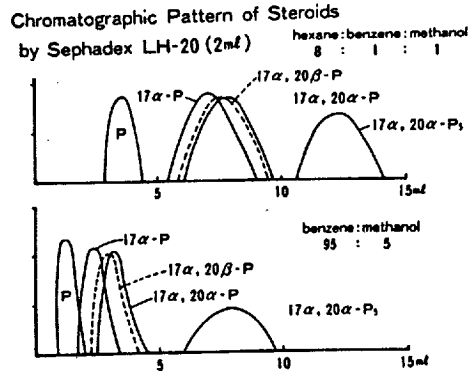


図4. Sephadex LH-20のカラムクロマトによる分画

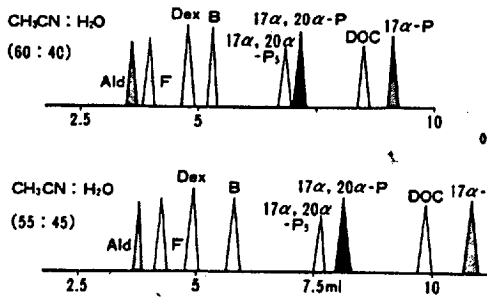


図5. HPLCによる各ステロイドの溶出パターン

表2. 分娩後の母体と新生児の血中濃度推移

	Mother		Neonate	
	$17\alpha\text{OHP}$	$17\alpha 20\alpha\text{-P}$	$17\alpha\text{OHP}$	$17\alpha 20\alpha\text{-P}$
Puerperium before	$5.8 \pm 2.2$	$0.36 \pm 0.10$	$12.7 \pm 4.40$	$0.33 \pm 0.05^*$
1	$2.5 \pm 1.0$	$0.18 \pm 0.08$	$7.2 \pm 2.30$	$0.20 \pm 0.03$
2	$1.7 \pm 0.7$	$0.14 \pm 0.04$	$4.5 \pm 1.40$	$0.13 \pm 0.02$
3	$1.3 \pm 0.5$	$0.10 \pm 0.03$	$2.8 \pm 0.80$	$0.08 \pm 0.01$
6	$0.9 \pm 0.4$	$0.09 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.25$	$0.07 \pm 0.02$

\* Cord

mean  $\pm$  S. D. ng/ml

図6. 妊娠の進行と母体血中P,  $17\alpha\text{-OHP}$

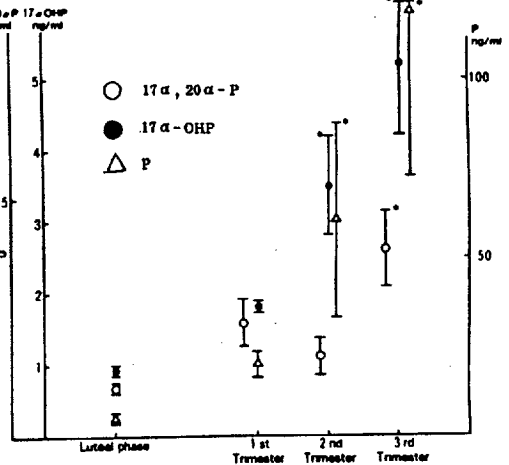


図6. 妊娠の進行と母体血中P,  $17\alpha\text{-OHP}$

および  $17\alpha, 20\alpha\text{-P}$ の推移



## 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】

21 水酸化酵素欠損児は 17 $\beta$ -hydroxyprogesterone(17 $\beta$ -OHP)が高値になるが、同時に高値を示すものとして 21-deoxycortisol と 17 $\beta$ -hydroxypregnenolone sulfate が報告されている。我々は 17 $\beta$ -OHP が体内で高くなると代償的に 20 位のケトンが還元された 17 $\beta$ ,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one(17 $\beta$ ,20 $\beta$ -P)が高値になるのではないかと考え、このステロイドの Radioimmunoassay を開発し、これが 17 $\beta$ -OHP とどのような関係にあるかを検討したので報告する。