

簡易化された高速液体クロマトグラフィー による内因性ステロイドの一斉分析法

—先天性副腎皮質過形成の診断への応用—

矢田 純一, 税所 純敬, 下澤 和彦
(東京医科歯科大学医学部小児科)

研究目的

先天性副腎過形成 (CAH) の新生児マス・スクリーニングにあたって, より簡便かつ高感度の高速液体クロマトグラフィーにより 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP), 21-deoxycortisol (21-DOF) のみならず, 多くの内因性ステロイドの一斉分析を可能とすることを目的とする。

研究方法

1. 試薬: 移動相として使用した Methanol, Acetonitrile, 抽出操作に使用した Dichloromethane は, 和光純薬製液体クロマトグラフィー用特級, Sodium hydroxide は和光純薬特級を用いた。また Standard steroid として Cortisone (E), Hydrocortisone (F), 21-Deoxycortisone (21-DOE), Dexamethazone (DXM), Corticosterone (B), Deoxycortisol (S), Androstenedione (Δ^4 -A), Deoxycorticosterone (DOC), Testosterone (T), 17-OHP は Sigma 社製のものを, 21-DOF は帝国臓器製のものを使用した。

2. HPLC 条件: ポンプには日本分光製 TWINCLE を, 検出器には日本分光製の UV spectrophotometer UVIDEC 100-V を用い, 検出波長は 254nm あるいは 246nm とし, カラムには本カラムとしてエルマ光学社製の ERC-ODS-1161 (6mm ϕ $\times$ 10cm, 粒子サイズ 3 μ) プレカラムとして ERC-ODS-1652 (6mm ϕ $\times$ 3cm, 粒子サイズ 5 μ) を使用した。移動相には Methanol, Acetonitrile, 水を Volume 比で 55 対 3 対 42 で含む溶液を使用し, 流速 1.5 ml/min, Range 0.0025 または 0.005 にて室温で分析した。

3. 抽出・測定法: 抽出法には従来よりの Dichloromethane 抽出法を行なった。栓付き試験管に血清 0.5 ml, 内部標準としての DXM 50ng, NaOH 0.1 ml を加え混和後, Dichloromethane 8 ml を加え, 30 分間振盪し抽出。下層の Dichloromethane 層をツ反用注射器にて別の栓付き試験管に取り水 2 ml 加え 15 分間振盪し洗浄後, Dichloromethane 層を取り減圧乾固し, そこに水 40 μ l を加え十分に溶解後, 20 μ l を HPLC にかけた。

実際の測定に先だち, 正常人血清に Standard steroid を加え各ステロイドの Retention time, 回収率および Peak の比を求めた。血中ステロイド濃度の算出は次式により行なった。

$$50ng \times \frac{H}{H_{DXM}} \times \frac{1}{\text{Peak ratio}} \times \frac{1}{0.5}$$

H：各ステロイドの chromatogram 上の Peak の高さ

H_{DXM}：DXM の chromatogram 上の Peak の高さ

Peak ratio：あらかじめ求めた回収率を含めた各ステロイドの DXM に対する
Peak の高さの比

研 究 結 果

1. **Retention time**：正常人血清に種々のステロイドを加えた時の Retention time を Table 1 に、その chromatogram を Fig.1 左側に示す。HPLC に注入後、E、F、21-DOF、DXM、S、 Δ^4 -A、DOC、T、17-OHP の順で peak が出現するが、その分離は良好であった。また表1の右側には各ステロイドの Retention time と DXM の Retention time との比を示したが、各ステロイドの同定のために DXM の Retention time の比にすると変動は著しく小さくなり、chromatogram 中のステロイドの同定が確実となった。

2. **回収率**：Table 2 に抽出操作を含めた本測定法の全回収率を示した。E および DXM で若干低値を示したが、回収率は安定していた。表2の右側には DXM の peak の高さを 1 とした時の回収率も含めた各ステロイドの peak の高さの比を示した。Peak ratio の変動係数も全て 10% 以下であった。

3. **実際の測定**：図1右側に臍帯血の chromatogram を示す。臍帯血では、E が F より高く 17-OHP も高いといわれているが、E は F より高く 17-OHP の peak も認められる。この検体では、E 170.9 ng/ml、F 44.8 ng/ml、17-OHP 31.3 ng/ml、であった。

Fig.2 には CAH の初発時の患者血清の chromatogram を示したが、E、F の peak は低く、17-OHP、21-DOF の peak が明瞭に認められ、かつ Δ^4 -A と思われる peak も出現し、E 49.1 ng/ml、F 21.0 ng/ml、21-DOF 102.9 ng/ml、17-OHP 277.8 ng/ml であった。

Fig.3 に CAH コントロール中の患児の chromatogram を示した。左はコントロール良好の患児、右はコントロール不良の患児のものである。コントロール良好のものでは E、F 以外の peak は見られず、コントロール不良のものでは E、F が低く、17-OHP、21-DOF は鋭く高い peak として認められた。またこれ以外にも T や 21-DOE と思われる peak、あるいは他の不明 peak が出現した。この患児の各ステロイド濃度は、E 13.7 ng/ml、F 9.1 ng/ml、21-DOF 34.5 ng/ml、17-OHP 239.9 ng/ml であった。

Table 3 に HPLC より測定した臍帯静脈血、正常 1 ヶ月児、CAH 患児の E、F、17-OHP、21-DOF 濃度を示した。臍帯血では E (159.7 ng/ml) が F (93.3 ng/ml) より高く、17-OHP も 8 例中 7 例に検出され 17.4 ± 12.4 ng/ml であった。正常 1 ヶ月児では 17-OHP、21-DOF 共に検出されず、E (39.8 ng/ml) より F (53.0 ng/ml) の方が有意に高値であった。未治療の CAH 患児では 17-OHP 20.44 ± 267.2 (26.8 ~ 851) ng/ml、21-DOF 133.7 ± 182.4 (7.5 ~ 499) ng/ml とともに高く、E、F も正常 1 ヶ月児と同程度に認められた。コントロール不良の患児では 17-OHP は 125.6 ± 134.4 (0 ~ 389.4) ng/ml、

21-D O Fは 17.8 ± 22.6 (0 ~ 59.6) ng/ml と高く, コントロール良好な群では21-D O Fは認められず, 17-O H Pはごくわずかに検出されたのみであった。またFはコントロール良好群で有意に高値であった。

考 按

逆相系のH P L Cを用いることにより, E, F, 17-O H P, 21-D O Fをはじめとした, 同一検体中のステロイドの簡便な一斉分析が可能となった。臍帯血, C A H初発患者, およびコントロール不良患児の chromatogramは, 正常人血清と同様なパターンであるコントロール良好な患児の chromatogramと比較すると, 一部には21-D O E, S, Tと思われるpeakを認めるものの, 種々の不明のpeakが見られた。これらのことはC A Hの場合正常状態では存在しないステロイド, あるいは不明のステロイド代謝が働いていることを示唆している。このことはまた実際に不明のpeakが接近しすぎた場合の chromatogram上の大きな測定誤差, すなわち実際より高値と読んでしまう危険性をも示唆している。事実Fig 4に示した17-O H Pと21-D O FでのR I Aとの相関では, 17-O H Pは満足されるが, 21-D O Fにおいて⊙で示した2検体において, H P L Cでは著しい高値を示しており, R I Aとの discrepancyを示す検体の存在が示された。

今回の研究で行なったDichloromethane抽出法では, E, DXMの回収率が若干低く, 今後解決しなければならない問題と思われる。現在Bond-Elut, Sep pack C_{18} , Extreluteなどの簡易カラムによる前処理で満足のいく回収率が得られるか否か検討中である。

また正常人血清0.5 mlに各ステロイド5 ng 加えた時でもそれぞれのpeakが明瞭に分離できているので本測定法の感度は少なくとも10 ng/ml と考えられる。将来的には蛍光検出器, 電気化学検出器などを応用して, 高感度化をめざし, 汚紙血による分析をも可能としたい。これによりマス・スクリーニングでの recall 率を著しく減少させることのみならず, さらに病型診断をも含めたC A Hの診断が可能になるものと思われる。

Table 1 RETENTION TIME AND THE RATIO OF RETENTION TIME OF NATURAL STEROIDS TO THAT OF DEXAMETHAZONE

	RETENTION TIME (MIN)	CV(%)	RELATIVE RETENTION TIME RATIO	CV(%)
Cortisone (E)	4.61±0.32	6.9	0.546±0.016	2.9
Hydrocortisone (F)	5.68±0.47	8.3	0.671±0.034	5.1
11 β -OH- Δ^4 A	6.93±0.38	5.5	0.828±0.013	1.6
21-Deoxycortisol (21-DOF)	7.38±0.35	4.7	0.875±0.009	1.0
21-Deoxycortisone (21-DOE)	7.85±0.35	4.5	0.907±0.012	1.3
Dexamethazone (DXM)	8.44±0.37	4.4	1	
Corticosterone (B)	8.80±0.26	3.0	1.020±0.010	1.0
Deoxycortisol (S)	9.11±0.38	4.2	1.080±0.013	1.2
Androstenedione (Δ^4 -A)	12.36±0.53	4.3	1.465±0.075	5.1
Deoxycorticosterone (DOC)	15.04±0.56	3.7	1.784±0.039	2.2
Testosterone (T)	16.04±0.59	3.7	1.901±0.041	2.2
17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP)	19.14±0.69	3.6	2.271±0.063	2.8

(MEAN±SD)

Table 2 RECOVERY OF NATURAL STEROIDS AND DEXAMETHAZONE AND RATIO OF PEAK HEIGHT OF NATURAL STEROIDS TO THE HEIGHT OF DEXAMETHAZONE

	Recovery(%)	CV(%)	Peak ratio	CV(%)
Cortisone (E)	58.1±4.83	8.3	1.83±0.05	2.7
Hydrocortisone (F)	79.4±6.96	8.8	2.05±0.07	3.4
21-Deoxycortisol (21-DOF)	88.6±0.64	0.7	2.22±0.11	5.0
Dexamethazone (DXM)	69.9±4.01	5.7	1	
Deoxycortisol (S)	80.7±1.80	2.2	1.23±0.01	0.8
Androstenedione (Δ^4 -A)	80.0±3.01	3.8	1.30±0.12	9.2
Deoxycorticosterone (DOC)	86.1±2.79	3.2	0.66±0.057	8.6
Testosterone (T)	88.2±2.65	3.0	0.93±0.057	6.1
17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP)	96.8±2.19	2.3	0.71±0.046	6.5

(MEAN±SD)

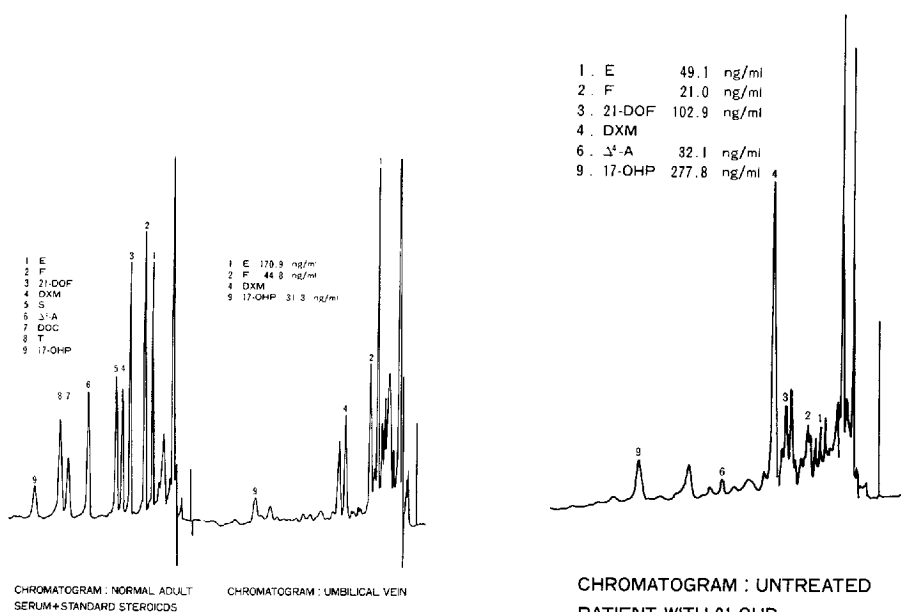


Fig. 1

Fig. 2

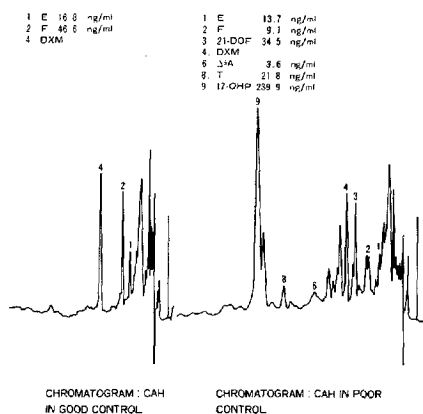


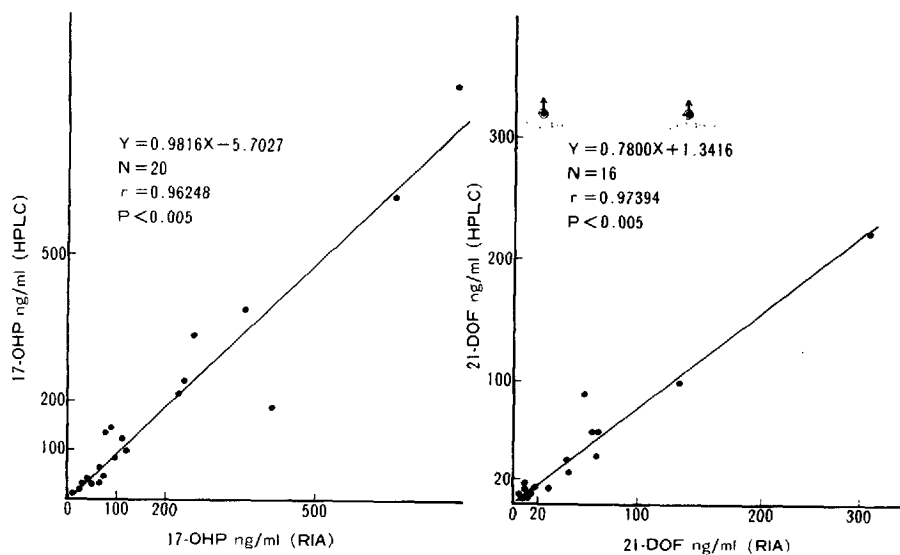
Fig. 3

Table 3 ESTIMATED VALUE OF VARIOUS STEROIDS BY HPLC

	E	F	17-OHP	21-DOF
UMBILICAL VEIN (n=8)	159.7±26.3	93.3±58.9	17.4±12.4	ND
INFANT(ONE MONTH OLD)(n=12)	39.8±12.0	53.0±28.4	ND	ND
CAH UNTREATED (n=12)	23.9±18.8	53.0±25.6	204.4±267.2	133.7±182.4
POOR CONTROL (n=7)	15.5±5.5	54.9±65.4	125.6±134.4	17.8±22.6
ADEQUATE CONTROL(n=11)	29.8±36.9	87.2±86.8	0.37±1.24	ND

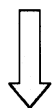
ND : NOT DETECTED

(ng/ml : MEAN±SD)



CORRELATION BETWEEN SERUM 17-OHP AND 21-DOF CONCENTRATIONS BY RIA AND BY HPLC

Fig. 4



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

先天性副腎過形成(CAH)の新生児マス・スクリーニングにあたって,より簡便かつ高感度の高速液体クロマトグラフィーにより 17 α -hydroxyprogesterone(17-OHP),21-deoxy-cortisol(21-DOF)のみならず,多くの内因性ステロイドの一斉分析を可能とすることを目的とする。