

17 - hydroxy progesteroneの新しい抗血清について

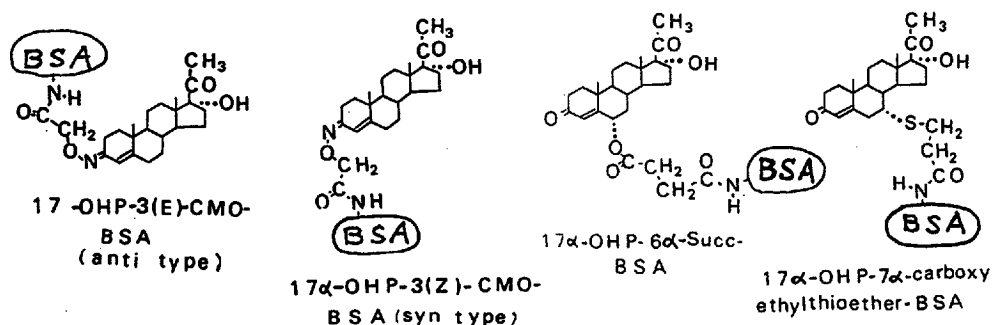
神戸川 明
(帝京大産婦人科)

研 究 目 的

17-OHPの測定に本邦で用いられている抗血清は1974年に我々が合成した17-OHP-3-carboxymethyl oxime・BSAの抗血清であり¹⁾、RIA²⁾やETA³⁾等多くの報告がある。この抗原のハブテンに用いた17-OH-P-3-CMOはその後の核磁気共鳴(n, m, r,)の分析から幾何学異性体3Eと3Zの混合物であることが判明し、これをメチル化することで分離ができるようになった。この立体異性体の3Eの抗体を作った結果、抗体力価5倍に、また特異性もよくなり、従来の抗血清では17-OH-pregnenolone(17-OHP₅)の交叉反応が多くてfalse positiveが多い欠点があったが、これが解決された。また17-OHP-6 α -Succ-BSAを合成し、これによって作った抗血清およびLindnerから恵与された17-OHP-7 α -carboxyethylthio ether(17-OHP-7 α -CET)の抗血清の特性を検討し、17-OHPの測定にはどの抗血清がよいかをしらべた。

研 究 方 法

ハブテンの合成法：従来の方法¹⁾で作った17-OHP-3-CMOは図1の如くoximeのNとOの配位が斜め上のE型と下に出ているZ型との異性体の混合物で、その量比は常に3:2であった。これはn, m, r,で4位のプロトンとC-19のメチルによって判定でき、E体は4位のHが17-OHPと同じ5.7 ppmにあったが、19-メチルは高磁場に0.05移動した。Z体は逆に4位のみが6.4と低磁場に移動した。このn, m, r,を指標としてEとZの分離を行った。すなわちシリカゲルクロマトで副産物17-OHP-20-CMOを除いた後の3(mix)-CMOをメタノールにとかし、ジアゾメタンでメチルエステルとし、TLCに付し、クロロホルムで3回展開して上部の3(E)-CMO-Meと下部の3(Z)-CMO-Meを各々アセトンで溶出した。このメタノール液にCN-NaOHを加えて室温で鹼化して脱メチルして前者は純品の3(E)-CMOを得たが、後者は一部E型に転位した。



なおこの3(Z)-CMO-Meをエステラーゼで中性で水解したが、3(E)に一部転位し純の3Zは得られなかった。17-OHP-6 α -Succinateは6 α -hydroxy-17-OHPを無水コハク酸とピリジンと reflux して作った。17-OHP-7 α -CETは合成が間に合わず Lindner の抗血清を用いた。

抗原の合成と抗血清の作成法：ハブテンにイソブチルクロロ酢酸を反応させて混合酸無水物をつくり BSA に結合させ抗原とした。この抗原の BSA 1 モルに結合した 17-OHP のモル数は UV 吸収から計算した結果 25~30 であった。抗血清は抗原 1mg / 0.5ml 生食液を complete Freund's adjuvant で乳化してこれを家兎の背皮内と踵間に 4 週毎に注射し最後の booster は脾内注入し、10 日後に採血した。放射性標識物は 17-OHP-1,2,6,7-³H 100Ci / mM (NEN) と 17-OHP-3-CMO-histamine - ¹²⁵I (Amersham) を用いた。作製した抗血清の力価は ³H を用いて 17-OHP の標準曲線が直線になるときの抗血清の至適希釈倍で示し、特異性は 17-OHP と類似であり、且つ血中に多く存在する 17-OH-pregnenolone (17-OHP₅) とその Sulfate の交叉反応率で評価した。

抗血清の吸収実験法：17-OHP 抗血清に 17-OHP₅-3-Succ-BSA を加えて生ずる不溶性物質を遠沈して除く。この上澄の抗血清について力価と交叉反応率を検討した。

RIA 法：³H を用いる RIA は我々の報告した方法を用い²⁾、¹²⁵I を用いる RIA は第二抗体法で測定した。

研究結果

17-OHP-³H を用いたときの各抗血清による 17-OHP の標準曲線と特性を表 1 に示す。従来の 3 (mix) CMO の抗血清 (希釈) は至適希釈倍数が 10⁵ 倍で、このときの ³H 結合率は 80%、この ³H の結合を 50% 阻害するに要する 17-OHP 量は 30 pg であった。これに対して新規抗血清 3(E)-CMO は 5 × 10⁵ と 5 倍高くこのときの結合率は 85%、50% 阻害 17-OHP 量 16 pg と 3 (mix) よりも抗体価が高く、標準曲線が急峻であった。また 3E の交叉反応は従来の 3mix より少なく、17-OHP₅ とこれらの Sulfate が 1.2% と 1% であることから血中のこれらのステロイドは無視できるようになった。感度も従来の 3 pg に対して新規 3E 抗血清は 1 pg であり、0 pg と 1 pg では有意の差で測定できた。マスマスクリーニング用染血濾紙では本抗血清を用いるとき 3mm² ディスク 1 枚で充分に測定ができ、測定精度も高かった。6 α または 7 α にスプーサーを介して BSA を結合させたときの抗血清は表 1 の如く希釈倍 10⁴ と 7 α は希釈率不明であったが、B₀/T、50% 阻害量、感度ともに 7 α の方が良く、3E に匹敵するものであった。

17 α -OHP-1,2,6,7-³H を用いたときの各種抗血清の特性

Antigen	17 α -OHP-3-(mix)-CMO-BSA	17 α -OHP-3-(E)-CMO-BSA	17 α OHP-6 α -Succ-BSA	17 α -OHP-7 α -CET-BSA
antiseria Lot. No.	Telzo	45-3	423-3	from Lidner
RIA 至適希釈倍	x 100,000	x 500,000	x 10,000	—
B ₀ /T	80 %	85 %	60 %	65 %
³ H 結合 50% 阻害量	30 pg	16 pg	200 pg	21 pg
感度	3 pg	1 pg	20 pg	2 pg
Cross reaction				
17 α -OHP	100 %	100 %	100 %	100 %
17 α -OHP ₅	6.3%	1.2%	4.5%	0.4%
17 α -OHP ₅ -3-sulfate	3.5%	1.0%	0.5%	0.05%
20 α -OHP	3.2%	0.01%	2.0%	0.01%
P	7.9%	0.2%	5.0%	0.1%

P: progesterone P₅: pregnenolone CET: carboxyethylthioether

17 α -OHP-3-CMO-His-¹²⁵I を用いたときの各種抗血清の特性

Antigen	17 α -OHP-3-(mix)-CMO-BSA	17 α -OHP-3-(E)-CMO-BSA	17 α OHP-6 α -Succ-BSA	17 α -OHP-7 α -CET-BSA
antiseria Lot. No.	Telzo	45-3	423-3	from Lidner
RIA 至適希釈倍	x 20,000	x 20,000	x 2,000	—
B ₀ /T	65 %	65 %	50 %	42 %
¹²⁵ I 結合 50% 阻害量	62 pg	30 pg	50 pg	10 pg
感度	5 pg	2 pg	10 pg	1 pg
Cross reaction				
17 α -OHP	100 %	100 %	100 %	100 %
17 α -OHP ₅	40 %	35 %	22 %	4.3 %
17 α -OHP ₅ -3-sulfate	4.5%	0.3%	0.5%	0.05%
20 α -OHP	3.5%	0.3%	1.0%	0.03%
P	8.3%	3.0%	2.5%	1.1%

P: progesterone P₅: pregnenolone CET: carboxyethylthioether

また交叉反応率はむしろ3Eよりも小さくすぐれた抗血清であり、現在自製中である。次に¹²⁵I標識17-OHPを用いたときの各抗血清の標準曲線と交叉反応率を表2に示す。至適希釈倍率は³Hにくらべて低く標準曲線は急峻でなく、17-OHP₅との交叉反応性も大きい。これは標識物と同型の3-CMOの抗血清では両者の結合が強くて、17-OHPで標識物質の結合を阻害するのに³Hの場合よりも多くの量を要した。なお7 α -CET抗血清と3-CMO-His-¹²⁵Iとは異型の組合せであるため、結合は42%と弱い感度が1pgと高かった。しかし特異性は³Hの場合よりも悪く、標識する場所を種々変えて、各抗血清の組合せを検討することが必要であった。

3E抗血清における17-OHP₅の交叉反応性をゼロにするため、17-OHP₅-3-Succ-BSAで吸収操作した結果、吸収によって抗体力価は低下したが17-OHP₅やprogesteroneの交叉反応率は全く変らなかった。

考 案

ステロイドの特異性の高い抗血清を作るためには、そのステロイド特有の感応基から離れた所にBSAをつけるためのスペーサーをつける必要がある。17-OHPの場合、認識させる重要な所は17 α -ol-20-oneであるので、21位にBSAをつけると、11-deoxycortisolとも反応して特異性がなくなる。BSAをつける所は3と6 α 、7 α および11 α が構造上適当であることが推定されるが、6 α 、7 α 、11 α につけたものはその位置に水酸基またはケトン基をもつものが交叉反応を示すようになる。3につけることは17-OHPそのものを認識することで広く4-en-3-oneをもつステロイドの抗原に用いられているが、今回作った3Eはoximeが斜め上についていて二重結合と離れているため、この二重結合の構造をよく認識できる。逆に3Zはoximeが下に出ていて二重結合に近いので、二重結合の認識が甘くなることを示している。以上のことから3(mix)よりも3Eの抗血清の特異性の高いものができることが構造上からも実証できた。また、6 α と7 α は4,5の二重結合から遠くなる程、17 α -OHP₅との交叉反応性が小さくなり7 α が3Eよりも二重結合に対して特異的によく認識し得た。7 α の抗血清を用いる場合には血中に7とか6に水酸基およびケトン基をもつ17-OHPの値を変える量が入っていないことを確かめる必要がある。なお¹²⁵I標識でRIAを行う場合、標識と抗血清とが同型の組合せより少し構造が異なる異型の組合せがよく、この組合せはEIAにも応用できると考えられる。

文 献

- 1) 吉田孝雄, 神戸川 明: 17 α -hydroxyprogesteroneのRIAについて, ホルモンと臨床, 22: 773-80, 1974.
- 2) 神戸川 明, 下沢和彦, 斉藤喜親: 血液浸染濾紙中17-OHPのRIAによるマススクリーニング法. ホルモンと臨床, 28: 773-776, 1980.
- 3) Arakawa H., Maeda M., Tsuji A., Naruse H., Suzuki E., and Kambegawa A: Fluorescence enzyme immunoassay of 17-OHP in dried blood samples on filter paper and its application to Mass screening for CAH. Chem. Pharm. Bull. 31: 2724, 1983.



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

17-OHP の測定に本邦で用いられている抗血清は 1974 年に我々が合成した 17-OHP - 3 - carboxymethyl oxime·BSA の抗血清であり 1)RIA2)や ETA3)等多くの報告がある。この抗原のハプテンに用いた 17-OH-P-3-CMO はその後の核磁気共鳴(n,m,r,)の分析から幾何学異性体 3日と 3Z の混合物であることが判明し,これをメチル化することで分離ができるようになった。この立体異性体の 3E の抗体を作った結果,抗体力価 5 倍に,'また特異性もよくなり,従来の抗血清では 17-OH-pregnenolone(17-OHP5)の交叉反応が多くて false positive が多い欠点があったが,これが解決された。また 17-OHP-6 - Succ-BSA を合成し,これによって作った抗血清および Lindner から恵与された 17-OHP-7 - carboxyethylthio ether(17-OHP-7 -CET)の抗血清の特性を検討し,17-OHP の測定にはどの抗血清がよいかをしらべた。