

HPLCによる濾紙血中のステロイドの

定量に関する研究

上 芝 元、入 江 実

(東邦大学医学部第一内科)

林 時 司、成 瀬 浩

(国立武蔵療養所神経センター)

研究目的

先天性副腎皮質過形成(CAH)は、従来の報告の発生頻度より高いことが証明されつつある。CAHの中で最も多いのは、21-水酸化酵素欠損型であり、特に塩類喪失型は早期に診断および治療を行わなければ死に至る。そこで、新生児のマス・スクリーニングの1つに加えて、早期診断および治療の必要性が提唱されてきている。21-水酸化酵素欠損型では、血中17 α -hydroxyprogesterone(17-OHP)の増加が特徴的であり、現在17-OHPがRIAやEIAで測定されている。そのほか、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、血中17-OHPを定量分析する方法も行われている。

今回、CAHの一次スクリーニングで異常と思われる検体の精査法への応用、あるいはCAH以外の副腎皮質疾患のステロイド代謝のプロフィールの把握を目的とし、我々は、HPLCとRIAを結びつけた乾燥濾紙血中のステロイドホルモンの分析法について検討を行った。

研究方法

乾燥濾紙血(今回は9mm disk)に蒸留水を加えて、超音波洗浄器を利用し血液成分を溶出した。その混合物に内部標準(pyrene)の一定量と0.1N NaOHを加えてエーテル抽出した。その後、エーテル層を0.1N HClで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、蒸発乾固した。残渣を40% EtOHで再溶解してHPLC用試料とした。使用したHPLCの装置の概要は図1に示したが、あらかじめステロイドホルモン(今回は、Cortisol、11-Deoxycortisol、Androstenedione、Deoxycorticosterone、17-OHP、Testosterone、Progesteroneの7種類)のstandardにて各々のretention timeを決定しておき分取できるようにプログラムした。HPLCより7つの分画を取り、蒸発乾固した。その残渣をMeOHで溶解して、RIA用試料とした。

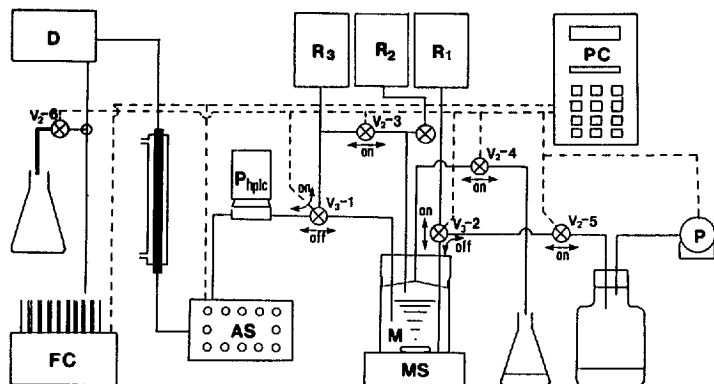


Fig. 1 Schematic Diagram of High-Performance Liquid Chromatographic System for the Analysis of Steroids in Dried Blood on Filter Paper

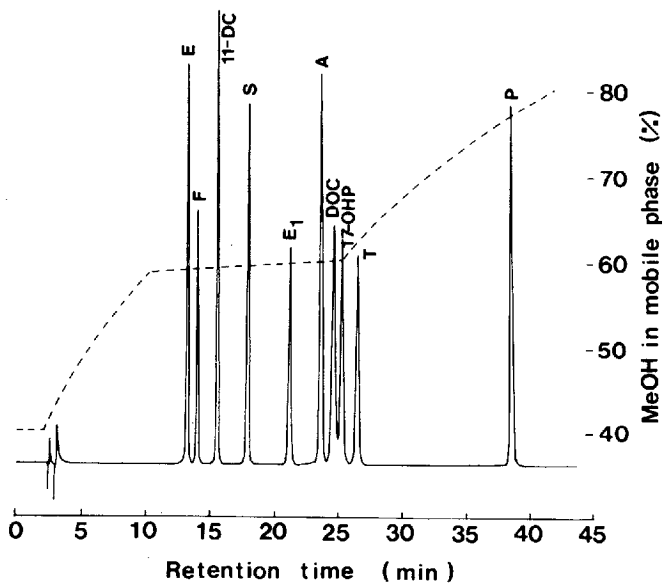


Fig. 2 High-Performance Liquid Chromatogram of a Standard Mixture of Steroids

HPLC conditions

column : NS-Gel C₁₈ (3 μ m, 250mm X 4.6mm i.d.), column temp : 50 °C,
 mixer : 20 ml, mobile phase : aqueous methanol (gradient elution),
 flow rate : 1.0 ml/min, detector : UV (240nm)

研究結果

ピークとして検出できない低濃度の試料を分取するためには、retention timeを目安としなければならないが、従来のgradient溶離装置では、retention timeの再現性が悪いため精密分取が困難であった。今回、林らが新しく開発した非常に再現性の良いgradient programmerを利用して精密分取を行った。図2にこの系によるステロイドの分離例を示す。この分離は、メタノール濃度を変化させるgradient溶離法で行った。条件の詳細は図2の却注に示した。

各ステロイドのretention timeの再現性は、CV値0.09～0.32%と良好な結果が得られた(n=13)。HPLCで分取した各分画中のステロイドの分析についても予備的な検討を実施したが、いづれのステロイドについてもRIAの系とのカップリングは充分可能であることが確かめられた。

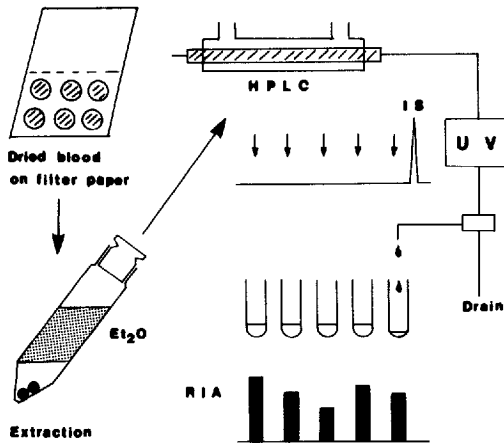


Fig. 3 Analysis of Steroids in Dried Blood on Filter Paper

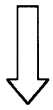
考 按

HPLCを用いたステロイドホルモンの分析において、検出にはUV法や蛍光法があるが、UV検出法では定量限界が10 ng/sample程度と思われ、異常値を示す試料以外は現在のモニタリングではピークとして検出できない。しかし、ピークとして検出できない低濃度の試料でも、今回のようにretention timeの再現性が良好であれば分取可能であり、それをRIAで測定すれば微量定量でき、なおかつプロフィールとして把握できると思われる。また、RIAのみの測定上問題となる交差反応についても、HPLCとカップリングすることにより信頼性の高いプロフィールの把握が可能であると考えられる(図3)。

今後は、今回開発した方法を実際の試料の分析に応用するとともに、HPLCにおける分離の改善、高速化、高感度検出法についても検討を行っていきたいと考えている。

文 献

- 1) Weisman, Y. et al. : Rapid diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by high performance liquid chromatography. Clin. Chim. Acta, 138 : 1-8, 1984.
- 2) Hayashi, T. et al. : Continuous gradient programmer for high-performance liquid chromatography. under preparation.
- 3) Loche, S. et al. : Clinical application of the rapid high-performance liquid chromatographic determination of cortisol. J. Chromatogr., 317 : 377-382, 1984.
- 4) Eibs, G. et al. : Simultaneous determination of fifteen steroid hormones from a single serum sample by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. J. Chromatogr., 310 : 386-389, 1984.
- 5) Schöneshöfer, M. et al. : Estimation of free urinary α -o-sterone and 18-hydroxycorticosterone by combination of automatic high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. J. Chromatogr., 227 : 492-496, 1982.
- 6) Imaizumi, N. et al. : Application of reversed-phase high performance liquid chromatography for radioimmunoassay of plasma 18-hydroxycorticosterone. J. Chromatogr., 308 : 295-300, 1984.
- 7) Pang, S. et al. : Microfilter paper method for 17-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45 : 1003-1008, 1977.
- 8) 竹田亮祐ほか：ステロイドホルモンの分析；最近の知見—高速液体クロマトグラフィー（HPLC）— 日本臨床, 42:2530-2535, 1984.
- 9) 下沢和彦：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 紙血液による血中17 α -hydroxyprogesteroneの測定. 日内分泌会誌, 59:1845-1859, 1983.
- 10) 神戸川 明ほか：血液浸染濾紙中17 α -OH-progesterone 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.



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

先天性副腎皮質過形成(CAH)は、従来の報告の発生頻度より高いことが証明されつつあるCAHの中で最も多いのは、21-水酸化酵素欠損型であり、特に塩類喪失型は早期に診断および治療を行わなければ死に至る。そこで、新生児のマス・スクリーニングの1つに加えて、早期診断および治療の必要性が提唱されてきている。21-水酸化酵素欠損型では、血中17- α -hydroxyprogesterone(17-OHP)の増加が特徴的であり、現在17-OHPがRIAやEIAで測定されている。そのほか、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、血中17-OHPを定量分析する方法も行われている。

今回、CAHの一次スクリーニングで異常と思われる検体の精査法への応用、あるいはCAH以外の副腎皮質疾患のステロイド代謝のプロフィールの把握を目的とし、我々は、HPLCとRIAを結びつけた乾燥濾紙血中のステロイドホルモンの分析法について検討を行った。