

新生児および先天性副腎皮質過形成患児の血中ステロイドパターンのHPLC/RIAによる分析

上芝 元, 宮地幸隆, 入江 実
(東邦大学医学部第一内科)

林 時司, 成瀬 浩
(国立精神・神経センター神経研究所)

研 究 目 的

21-水酸化酵素欠損(21-OHD)による先天性副腎皮質過形成(CAH)のマス・スクリーニングの方法として radioimmunoassay (RIA)や enzyme immunoassay (EIA)による乾燥濾紙血中17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP)の測定が用いられている。その際、測定に用いる抗体に対しての他のステロイドによる交叉反応のため、17-OHPが高値を示すことがあり、false positiveが生ずることもあり、その減少のために従来種々の工夫がなされている。我々は immunoassay における交叉反応の問題を解決でき、微量な単一試料から多種類のステロイドを一斉分析できる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とRIAを組み合わせた方法を用いて、新生児およびCAH患児の血中ステロイドパターンの分析を行った。また乾燥濾紙血中17-OHPも同じ方法により分析した。

研 究 方 法

血漿100 μ lに蒸留水および内部標準物質(3,7-dimethoxyflavone)を加え、エーテル抽出した。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発乾固した。残渣を40%エタノールで再溶解してHPLC用試料とした。HPLCにおいて各ステロイド〔今回はcortisol(F), androstenedione(A), 17-OHP, testosterone(T), progesterone(P), estrone(E₁), estradiol(E₂)〕の標準品を用いて保持時間をあらかじめ決定しておき、分取できるようにプログラムした。HPLCより各ステロイドの分画を採取し、蒸発乾固して、各々RIAにて定量を行った。(Fig.)

乾燥濾紙血の場合は、9mm disc 1枚に蒸留水を加え、超音波洗浄器にて振盪後、4℃一晩放置にて血液成分を溶出させた。溶出物に0.1N NaOHと内部標準物質を加え、エーテル抽出した。ついでエーテル層を0.1NHClで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発乾固した。以後の操作は血漿の場合と同様に行った。

研 究 結 果

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、HPLC の系を組み、精密分取を行った。この系における各ステロイドの保持時間の再現性、分離、回収率はそれぞれ良好であった。

正常新生児（生後約3週）10人について分析を行ったところ、F $12.6 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ (mean \pm S.D.), A $0.34 \pm 0.12 \text{ ng}/\text{ml}$, 17-OHP $1.8 \pm 0.36 \text{ ng}/\text{ml}$, T $0.88 \pm 0.59 \text{ ng}/\text{ml}$ (男児) $\cdot 0.24 \pm 0.20 \text{ ng}/\text{ml}$ (女児), P $0.65 \pm 0.20 \text{ ng}/\text{ml}$, E₁ $20 \pm 12 \text{ pg}/\text{ml}$, E₂ $42 \pm 21 \text{ pg}/\text{ml}$ となった。また21-OHD によるCAH患児の治療前の分析 (n=3) ではF $1.2 \sim 1.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ と著明低値, A $4.9 \sim 14.6 \text{ ng}/\text{ml}$, 17-OHP $59 \sim 114 \text{ ng}/\text{ml}$, T $5.9 \sim 8.2 \text{ ng}/\text{ml}$, P $16 \sim 29 \text{ ng}/\text{ml}$, E₁ $500 \sim 1800 \text{ pg}/\text{ml}$, E₂ $100 \sim 800 \text{ pg}/\text{ml}$ と著明高値を示した。hydrocortisone, Florinef などの治療によりF $14.0 \sim 34.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ と増加がみられ, A $0.20 \sim 0.90 \text{ ng}/\text{ml}$, 17-OHP $1.3 \sim 20 \text{ ng}/\text{ml}$, T $1.7 \sim 1.9 \text{ ng}/\text{ml}$, P $0.65 \sim 1.0 \text{ ng}/\text{ml}$, E₁ $250 \sim 300 \text{ pg}/\text{ml}$, E₂ $70 \sim 90 \text{ pg}/\text{ml}$ と改善がみられた。

正常新生児10人（生後7日前後）の乾燥濾紙血9mm disc 1枚を用いて、17-OHP を定量したところ $2.7 \pm 1.1 \text{ ng}/\text{ml}$ blood となった。21-OHD によるCAH患児では $35 \sim 75 \text{ ng}/\text{ml}$ blood となった。

考 按

HPLC とRIA を組み合わせた本法では、血漿 $100 \mu\text{l}$ と微量な試料量で多種類のステロイドが定量でき、immunoassay のみの測定上問題となる交叉反応についてもHPLC と組み合わせることで信頼性の高いプロフィールが得られると思われる。また、乾燥濾紙血中17-OHP も定量でき、濾紙血を用いた精査法としても実用可能と考えられる。

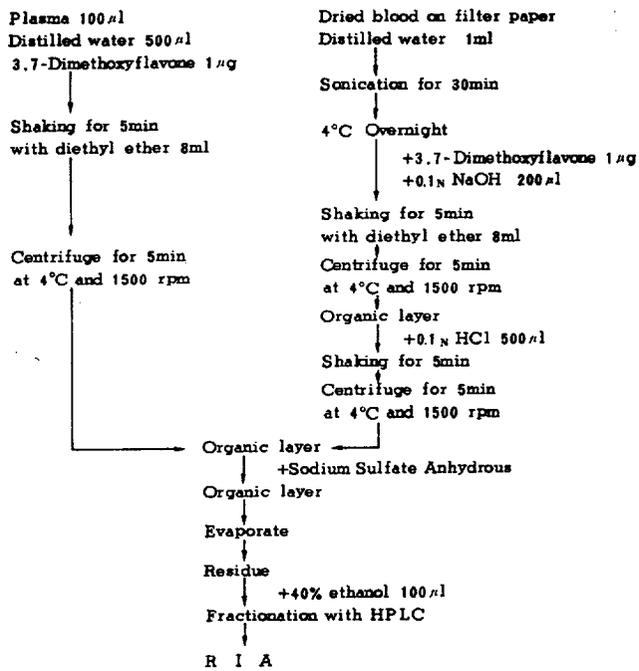
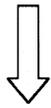


Fig. Analysis of steroid hormones



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(21-OHD)による先天性副腎皮質過形成(CAH)のマス・スクリーニングの方法として radio immunoassay(RIA)や enzyme immunoassay(EIA)による乾燥濾紙血中 17-hydroxy progesterone(17-OHP)の測定が用いられている。その際、測定に用いる抗体に対しての他のステロイドによる交叉反応のため、17-OHP が高直を示すことがあり、false positive が生ずることもあり、その減少のために従来種々の工夫がなされている。我々は immunoassay における交叉反応の問題を解決でき、微量な単一試料から多種類のステロイドを一斉分析できる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と RIA を組み合わせた方法を用いて、新生児および CAH 患児の血中ステロイドパターンの分析を行った。また乾燥濾紙血中 17-OHP も同じ方法により分析した。