

5 $\alpha$  Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol-3-glucuronideのE I Aの測定法の確立  
と先天性副腎過形成症の治療への応用  
(分担研究：マス・スクリーニングシステムの情報収集・利用に関する研究)

遠藤 彰<sup>1)</sup>、小川 治夫<sup>1)</sup>、五十嵐 良雄<sup>1)</sup>

浜松医科大学小児科<sup>1)</sup>

神戸川 明<sup>2)</sup>

帝国臓器<sup>2)</sup>

要約 マイクロプレートを用いた5 $\alpha$  Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol-3-glucuronide (5 $\alpha$  Adiol-3G) E I Aによる測定法を確立した。基礎的検討では、標準曲線は良好であり、測定感度は、0.1ng/ml、添加回収率は、119%、interassay variationは、CV5%以下であった。この系では、非抱合型アンドロゲンに対する交差反応が高いため、血清測定において、Sep-Pak C<sub>18</sub>による抽出を必要としたが、この簡便な方法のみで、直接測定が可能であった。尿は、抽出操作を必要とせず、直接測定が可能だった。

先天性副腎過形成症(21水酸化酵素欠損症)の一例における、初期治療の経過観察では、血清、尿ともに減少し、血清17 $\alpha$  OHP値、ACTH値とも良く連動していた。

見出し語：先天性副腎過形成症、5 $\alpha$  Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol-3-glucuronide、E I A

研究方法 1. 5 $\alpha$  Adiol-3GのE I Aによる測定法：5 $\alpha$ -Androstan-17-one-3-glucuronide (Sigma Co.)をNaBH<sub>4</sub>で17位を水酸化して、5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol-3-glucuronideを合成した。これに、N-hydroxysuccinimideをつけ、活性エステルを合成した。この活性エステルを用

いて、HRP、BSAをカップリングさせ、それぞれ酵素標識体、抗原とした(図1)。抗原は、家兎に免疫して、抗血清を得た。EIAは、第二抗体を吸着させたマイクロプレートを用いて行った(図2)。2. 先天性副腎過形成症患者における血清、尿中5 $\alpha$  Adiol-3Gの測定：対象患者はマス・スクリーニングにて発見さ

浜松医科大学小児科 (Dep. of Pediatrics,  
Hamamatsu Univ. School of Medicine)

れた先天性副腎過形成症男児一例(21水酸化酵素欠損症、塩喪失型)。

結果 1.  $5\alpha$  Adiol-3GのEIAによる測定法

A) 標準曲線(図3)と測定感度:  $5\text{pg}/\text{well}$  から  $500\text{pg}/\text{well}$  まで良好な直線が得られた。計算上、測定感度は  $0.1\text{ng}/\text{ml}$  であった。

B) 特異性: 50% インターセプト比は、グルクロナイド抱合物に対しては低いが、非抱合物に対しては高かった(表1)。このため、抱合物と非抱合物を Sep-Pak  $C_{18}$  を用いて分離抽出した。すなわち、血清を酸性化し、Sep-Pak  $C_{18}$  に充填し、水洗にて蛋白を除去、50% アセトニトリルで容出する。この操作により、アセトニトリル容出液に、抱合ステロイドは、100% 回収でき、非抱合ステロイドは容出してこなかった。尿は、非抱合ステロイドが少ないことより、直接バッファーで希釈して測定に共した。

C) 再現性、添加回収試験: 測定内変動係数は、4.9% であった。正確度を検討するために、尿  $1\text{ml}$  に各々 20, 50, 100, 200, 500,  $1000\text{pg}$  の  $5\alpha$  Adiol-3G を添加した後、尿中の  $5\alpha$  Adiol-3G 濃度を測定した。平均回収率は、119% と良好であった(表2)。

D) 希釈試験: 異なる3種の血清を前述のごとく、Sep-Pak  $C_{18}$  で抽出し、この抽出物を4段階にバッファーで希釈した。尿は、2種直接バッファーで4段階に希釈した。血清(図4)、尿(図5)共に良好な直線関係が得られた。

2. 先天性副腎過形成症患者における血清、尿中  $5\alpha$  Adiol-3G 濃度(表3): 尿、血清ともに、ヒドロコチゾンによる治療により、血清  $17\alpha$  OHP 値、血漿 ACTH 値と平行して

減少した。

考察  $5\alpha$  Adiol-3G は、多毛症の女性で、その血中濃度が高かったり、アンドロゲン分泌に傷害がある男性で低かったりと、末梢アンドロゲン作用の良い指標として注目されている。この点にかんして、先天性副腎過形成症(21水酸化酵素欠損症)のコントロールの指標として、日内変動がないことにより、血清  $17\alpha$  OHP 値よりも優れているとする報告が、近年みられるようになった。

しかし、これまでの報告は、 $5\alpha$  Adiol-3G 測定に対して煩雑な作業を必要としていた。すなわち、血清をまず有機溶媒で抽出し、非抱合体を除去した後、 $5\alpha$  Adiol-3G をグルクロニダーゼで水解し、 $5\alpha$  Adiol と抱合体をはずしてから有機溶媒で抽出し、HPLC 等で分解させた分画を RIA に共して測定していた。今回の、われわれの報告は、血清では、Sep-Pak  $C_{18}$  抽出を必要とするものの、簡単な操作により直接測定が可能であった。また、EIA による測定系としたため、日常の研究室で取り扱うことが可能となった。

先天性副腎過形成症(21水酸化酵素欠損症)における検討では、尿、血清ともに、初期治療における推移が、従来の血清  $17\alpha$  OHP 値とよく平行し、治療効果をみるマーカーとして評価できた。今回は、初期治療のみでの検討となったが、本症患者の長期的な管理の上で、骨年齢の増加度、身長増加加速に対するマーカーと成り得るか検討を進めている。

文献

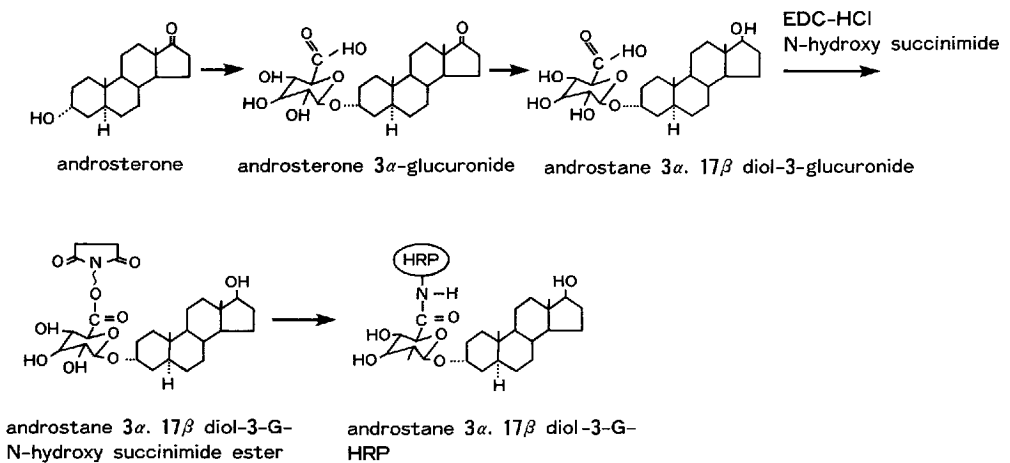
1) Pang S, et al. Normal and elevated

3  $\alpha$  -Androstenediol Glucuronide concentrations in women with various causes of hirsutism and its correlation with degree of hirsutism and androgen levels. J Clin Endocrinol Metab 75 : 243 -248, 1992

2) Reiner Bj, et al: Serum 3  $\alpha$  -Androstenediol glucuronide measurements in sexually mature women with congenital adrenal hyperplasia during therapy J Clin Endocrinol Metab 69 : 105-109, 1989

图1.

### Synthesis of 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ . 17 $\beta$ -diol-3-Glucuronide-HRP



### 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-GlucuronideのELISA

抗体：anti 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-Glucuronide-BSA  
rabbit serum

酵素標識物：5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-Glucuronide-HRP

図2.

測定法

検体：a) 血清

血清500 $\mu$ l + 1N-HCl50 $\mu$ l  
↓  
Sep-Pak C18  
↓  
水洗10ml  
↓  
50%アセトントリル2mlで溶出  
↓  
乾燥  
↓  
assay bufferで溶解

b) 尿

直接 assay bufferで希釈

検体：50 $\mu$ l

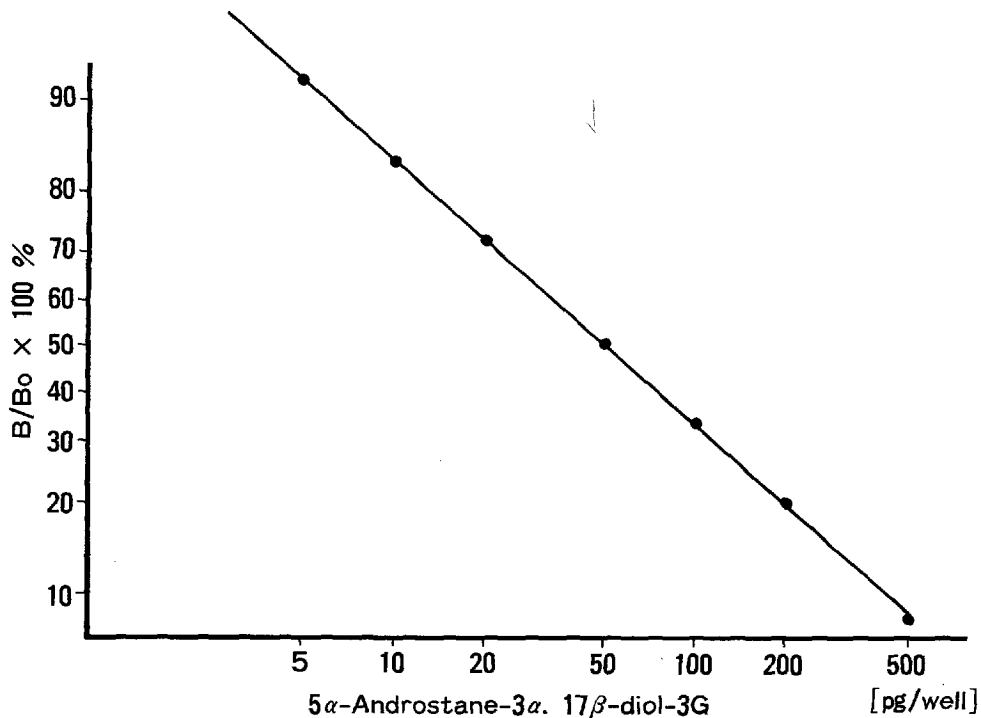
酵素標識物：5 $\alpha$ -Adiol-3G-HRP 2000倍希釈液 50 $\mu$ l

抗体：anti 5 $\alpha$ -Adiol-3G-BSA 20,000倍希釈液 50 $\mu$ l

↓  
室温3時間インキュベーション後0.05MPBで3回洗浄  
↓  
OPD試薬100 $\mu$ l加え、発色30分後6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 $\mu$ l加える  
↓  
マイクロプレートリーダーで492nmの光吸光度を測定

図3.

Dose-response curve for 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-glucuronide microplate enzyme immunoassay.



Effect of serum dilution on the measured level of 5 $\alpha$  Adiol-3G

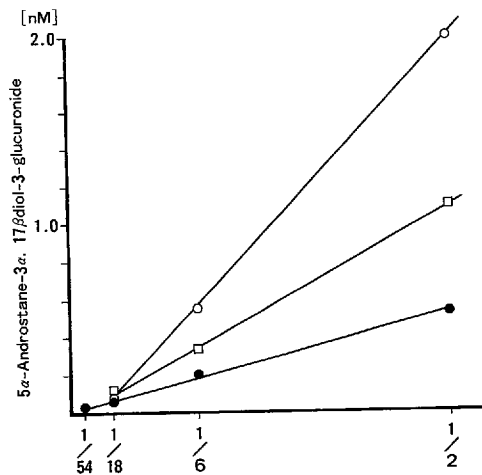


图4.

Effect of urine dilution on the measured level of 5 $\alpha$  Adiol-3G

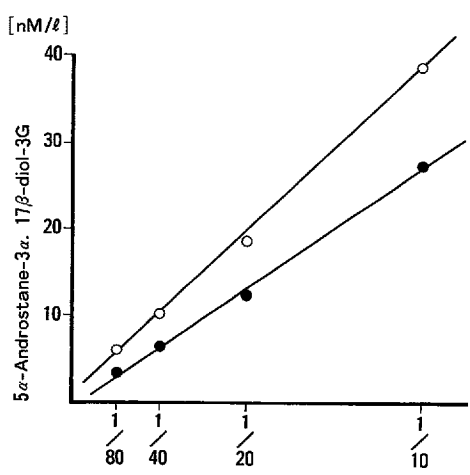


图5.

Percent cross reactivities of related steroids, in the microplate EIA system

Steroids	% cross-reaction
5 $\alpha$ -A-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-G	100
androsterone-3-G	10
5 $\beta$ -A-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-3-G	1
Etiocholanolone-3-G	0.3
DHEA-3-sulfate	0.06
Androsterone-3-sulfate	0.12
5 $\alpha$ -A-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-17-G	0.005
<hr/>	
5 $\alpha$ -A-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol	125
Androsterone	43
5 $\alpha$ -A-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	30
5 $\beta$ -A-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol	32
Etiocholanolone	2
Androst-5-ene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	15
Testosterone	200
DHT	176

表1.

The amount of each steroid causing 50% inhibition of the binding was compared and expressed in terms of %.

表2.

## Assay characteristics

## Accuracy

5 $\alpha$ -Adiol-3G (pg) added to urine	5 $\alpha$ -Adiol-3G (pg) measured	increment (pg)	accuracy
0	331	—	
20	348	17	0.85
50	407	76	1.52
100	500	169	1.69
200	554	223	1.12
500	823	492	0.98
1000	1325	994	0.99

表3.

先天性副腎過形成症 (21OHD) 一男児の治療における尿, 血清中5 $\alpha$  Adiol-3Gの推移

	5 $\alpha$ Adiol-3G 尿 [ $\mu$ g/ml]	血清 [ng/ml]	17OH-P [ng/ml]	ACTH [pg/ml]
治療前	>4.66	>93.3	140	896
3日後	0.12	—	2.86	17
14日後	0.11	23.2	19.4	62
40日後	—	4.7		12



## 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



要約 マイクロプレートを用いた 5 Androstane-3 ,17 diol-3-glucuronide(5 Adiol-3G)EIA による測定法を確立した。基礎的検討では、標準曲線は良好であり、測定感度は、0.1ng/ml、添加回収率は、119%、interaasay variation は、CV5%以下であった。この系では、非抱合型アンドロゲンに対する交差反応が高いため、血清測定において、Sep-Pak C18 による抽出を必要としたが、この簡便な方法のみで、直接測定が可能であった。尿は、抽出操作を必要とせず、直接測定が可能だった。

先天性副腎過形成症(21 水酸化酵素欠損症)の一例における、初期治療の経過観察では、血清、尿ともに減少し、血清 17 OHP 値、ACTH 値とも良く連動していた。