

## 副腎皮質過形成診断のための高速液体 クロマトグラフィーによる血中副腎皮 質ホルモンの一斉分析法について

### Simultaneous Analysis of $\Delta 4$ -3ketosteroids in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography to Diagnose of Congenital Adrenal Hyperplasia

水嶋 好清 福士 勝 荒井 修  
佐藤 勇次 林 英夫 高杉 信男

Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi,  
Osamu Arai, Yuji Sato,  
Hideo Hayashi and Nobuo Takasugi

CAHを診断するためのHPLCによる副腎皮質ホルモン10種(E, F, 21-DOF, B, S, And, DOC, T, 17-OHP, P)を一斉分析する方法を確認した。

EIAによる17-OHP測定のCAHマス・スクリーニングで発見された2例の患児は、HPLCによる一斉分析を行った結果、両者とも21-hydroxylase欠損で著増する17-OHP, 21-DOF, Andが検出され、HPLCによる測定の有効性が認められた。

## 1 緒 言

先天性副腎皮質過形成(CAH)は副腎皮質のcorticoid合成過程の酵素を先天的に欠乏するために起こり、その大部分は21-hydroxylase欠損症である<sup>1)</sup>。21-hydroxylaseが欠損すると、その前駆物質である17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone(17-OHP), 21-deoxycortisol(21-DOF),  $\Delta 4$ -androstenedione(And)などが著増し、Cortisol(F)の合成が阻害される。

CAHは副腎皮質のステロイドホルモンのうちで、正常では検出されない成分が増加し、そのパターン分析をすることにより、21-hydroxylase欠損や他の酵素欠損の診断に役立てることができ。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるUV検出の可能な主要10種のステロイドホルモ

ンの一斉分析を試み、CAH患児の測定をする機会が得られたので、その結果を報告する。

## 2 方 法

### 2-1 試 薬

ジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), メタノール(MeOH), アセトニトリル( $\text{CH}_3\text{CN}$ )は和光純薬液体クロマトグラフ用特級, 水酸化ナトリウム(NaOH)は和光純薬特級, Cortisone(E), Cortisol(F), Corticosterone(B), 11-deoxycortisol(S), 21-deoxycortisol(21-DOF), Deoxycorticosterone(DOC),  $\Delta 4$ -androstenedione(And), Testosterone(T), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone(17-OHP), Progesterone(P), 19-nor-testosterone(19-NT)純品はSigma社製品を用いた。

## 2-2 装 置

高速液体クロマトグラフィーは日立655型、検出器は日立638型UV検出器を用い、波長246 nmレンジ0.005に設定し使用した。カラムはBiophase ODS 5  $\mu$ m, 9インチ(Bioanalytical Systems Inc)で、カラムヒーターCL 22 A型(Bioanalytical Systems Inc) 中におさめ、カラム温度は40°Cで使用した。

## 2-3 移動相

移動相はMeOH : CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 55 : 3 : 42とし、流速は1.3 ml/minとした。

## 2-4 前処理方法

### (1) 抽出法

共栓試験管に血清100  $\mu$ lを採り、1 N-NaOH 100  $\mu$ l, 精製水800  $\mu$ l, 内部標準(19-NT)10 ngを加え、混合後、10 mlのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を加えて1分間振とう後、2,000 g, 10分間遠心分離し、上層をコメピペットで取り捨てる。精製水1 mlで2回洗浄し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8 mlを回収し、N<sub>2</sub>ガス下で乾固する。

### (2) Extrelut カラム法

あらかじめCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 mlで洗浄、乾燥したExtrelut 1カラム(Merck製)を用意し、血清100  $\mu$ l, 1 N-NaOH 100  $\mu$ l, 精製水800  $\mu$ l, 内部標準(19-NT)10 ngを混合したのちカラムに保持させる。15分後CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 mlをカラムに流し、流出したCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>をN<sub>2</sub>ガス下で乾固する。

## 2-5 測 定

### (1) 標 準

標準として各ステロイド(E, F, 21-DOF, B, S, And, DOC, T, 17-OHP, P)が1  $\mu$ g/mlとなるように移動相溶媒に溶解したものを10  $\mu$ lすなわち10 ngクロマトにかける。

### (2) Free血清 + 標準

T<sub>4</sub>-Free血清として調製した血清100  $\mu$ lに混合標準液(1  $\mu$ g/ml)を5, 10, 20  $\mu$ l加えて上記の前処理法により調製し、20  $\mu$ lの移動相溶媒で溶

解後、その10  $\mu$ lを試料とする。

### (3) 血 清

血清100  $\mu$ lを上記の前処理法により調製し、20  $\mu$ lの移動相溶媒で溶解後、その10  $\mu$ lを試料とする。

図1には標準, Free血清に各10 ng加えたもの, 正常成人の溶出パターンを示す。正常ではF以外には10 ng/ml以下となり検出されない。

## 3 結果及び考察

### 3-1 分析条件の検討

#### (1) 測定項目

副腎皮質におけるステロイドホルモン合成過程中の各種ステロイドホルモンの紫外部スペクトルを調べた結果、 $\Delta$ 4-3-ketosteroidのみが246 nm付近に最大吸収をもつことが認められ、HPLCによるUV検出が可能であった。そこで主要な10種のステロイドホルモンを測定項目として一斉分析を試みた。

#### (2) カ ラ ム

現在までに分析対象とした10種のステロイドホルモンを一斉に分析した例はO'Hare<sup>2)</sup>の文献があるが、グラジェント法でなお分離が完全でない。一部の分析では順相系で大西<sup>3)</sup>, 斉藤<sup>4)</sup>, 東條<sup>5)</sup>など、逆相系でScott<sup>6)</sup>, O'Hare<sup>2)</sup>などの分析があるが満足できるものは見当らなかった。そこで、逆相系のC-18型, C-8型, PAH型などのカラムについて10種のステロイドと19-NTの分析を検討した結果、C-18型が最も分析に適していた。

C-18型カラムでも各社で異なり、種々検討の結果Biophase-ODS-5  $\mu$ m, 9インチカラムが最もシャープに分離した。移動相がCH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O系ではB, Sがテーリングした。MeOH-H<sub>2</sub>O系ではすべてテーリングはなかったが、17-OHPとTが同一ピークとなり、CH<sub>3</sub>CNを3%加えたMeOH : CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 55 : 3 : 42の移動相にする

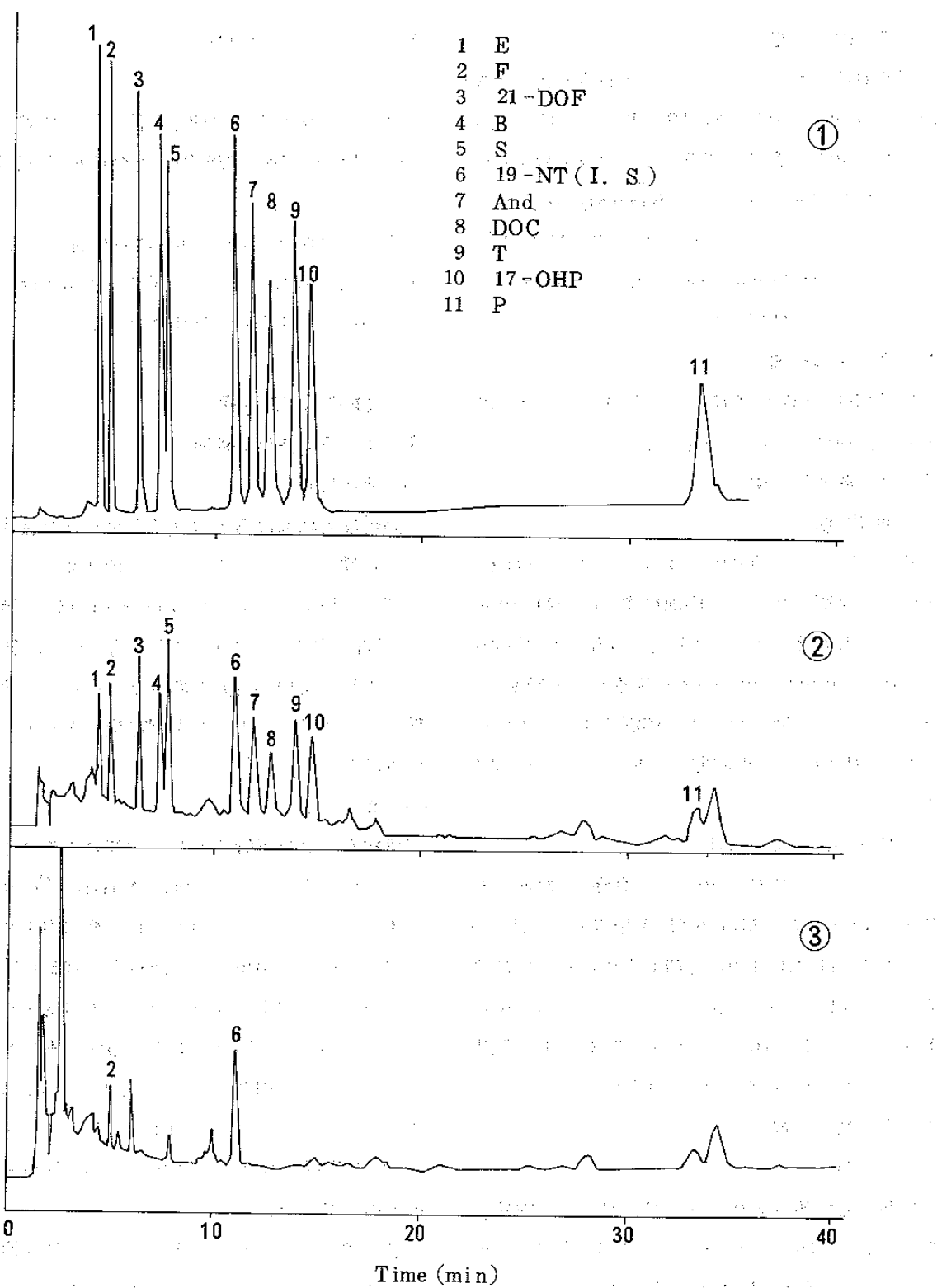


図1 HPLCによる溶出パターン

- ① 10種混合スタンダード10 ng+内部標準10 ng
- ② Free血清100  $\mu$ l+10種混合スタンダード10 ng+内部標準10 ng
- ③ 正常成人血清100  $\mu$ l+内部標準10 ng

ことですべての分離に成功した。

分析時間は70分と長いため、流速を速め13ml/minとし、カラム温度を40℃とすることで分析時間を35分に短縮することができた。

以後の分析はすべて上記の分析条件により行った。

### 3-2 試料の前処理法の検討

#### (1) 回収率

ボルテックスによる抽出法、ロータリーによる抽出法、Extrelut 1 カラムによる方法の3法についてFree血清に各スタンダードを5 ng, 10 ng, 20 ng 加えた時の回収率について検討した(表1)。3法を比較して、Extrelut 1 カラムによる方法がすべてについて最も回収率がよく、ロータリー法が最も低く、とくにE, F, DOCで低値であった。

表1 Free血清に各スタンダードを5, 10, 20 ng 加えた時の抽出法の差異による回収率(外部標準法)

	Rotary mix mean±SD	Vortex mix mean±SD	Extrelut 1 mean±SD
E	35.9 ± 2.53	42.7 ± 5.61	84.3 ± 11.60
F	56.7 ± 4.75	61.2 ± 6.16	91.3 ± 10.53
21-DOF	75.3 ± 5.74	90.1 ± 6.21	95.7 ± 10.82
B	61.3 ± 4.81	73.0 ± 5.82	89.6 ± 11.13
And	62.4 ± 5.89	80.2 ± 6.49	80.3 ± 6.37
DOC	50.2 ± 4.67	68.3 ± 5.03	73.2 ± 9.57
T	70.7 ± 5.39	84.3 ± 7.49	90.3 ± 7.78
17-OHP	66.8 ± 6.05	83.7 ± 10.46	80.9 ± 15.00

#### (2) 内部標準に対する回収率比

同一の回収率となると比は1となるが、Extrelut 1は、添加したスタンダードがほぼ均一に回収されており、一方他の方法ではE, F, DOCなどで低値であった(表2)。ばらつきはボルテックス法で大きく、これはエマルジョン形成が各試験管で一定でないためと思われる。Extrelut 1 カラムでは測定値の信頼性は±5%と考えられた。

表2 Free血清に各スタンダードを5, 10, 20 ng 加えた時の抽出法の差異による内部標準(19-NT)に対する回収率比

	Rotary mix mean±SD	Vortex mix mean±SD	Extrelut 1 mean±SD
E	0.51 ± 0.039	0.47 ± 0.054	0.95 ± 0.095
F	0.79 ± 0.050	0.69 ± 0.059	1.02 ± 0.064
21-DOF	1.05 ± 0.038	1.01 ± 0.103	1.04 ± 0.059
B	0.86 ± 0.050	0.82 ± 0.051	0.96 ± 0.068
And	0.88 ± 0.043	0.90 ± 0.106	0.80 ± 0.089
DOC	0.70 ± 0.041	0.77 ± 0.080	0.81 ± 0.058
T	0.99 ± 0.043	0.95 ± 0.118	1.01 ± 0.027
17-OHP	0.96 ± 0.061	0.94 ± 0.132	0.98 ± 0.047

#### (3) スタンダード直線

スタンダードを5 ng, 10 ng, 20 ng 添加したFree血清で比較した結果、3法とも相関係数はよく、スタンダードは直線的関係となった(表3)。定量限界は各ステロイドホルモンで血清1 ml当たり10 ngであった。

表3 内部標準法によるスタンダード直線の相関係数

	Rotary mix r	Vortex mix r	Extrelut 1 r
E	0.994	0.981	0.995
F	0.997	0.997	0.998
21-DOF	0.999	0.996	0.996
B	0.998	0.997	0.995
And	0.998	0.992	0.999
DOC	0.999	0.993	0.999
T	0.999	0.994	0.999
17-OHP	0.998	0.992	0.998

### 3-3 各種ステロイドの相対保持時間

分析の対象とした副腎皮質ホルモンの主要代謝産物10種のほかに、各種の酵素欠損で増大してくると思われるステロイドホルモンや、新生児期に多いとされている16-OH基のステロイドについてのRf値を求めた(表4)。

17種のステロイドと内部標準の19-NTはともによく分離して測定できた。また、各種の血清を測定し、内部標準の位置に妨害する血清成分は認

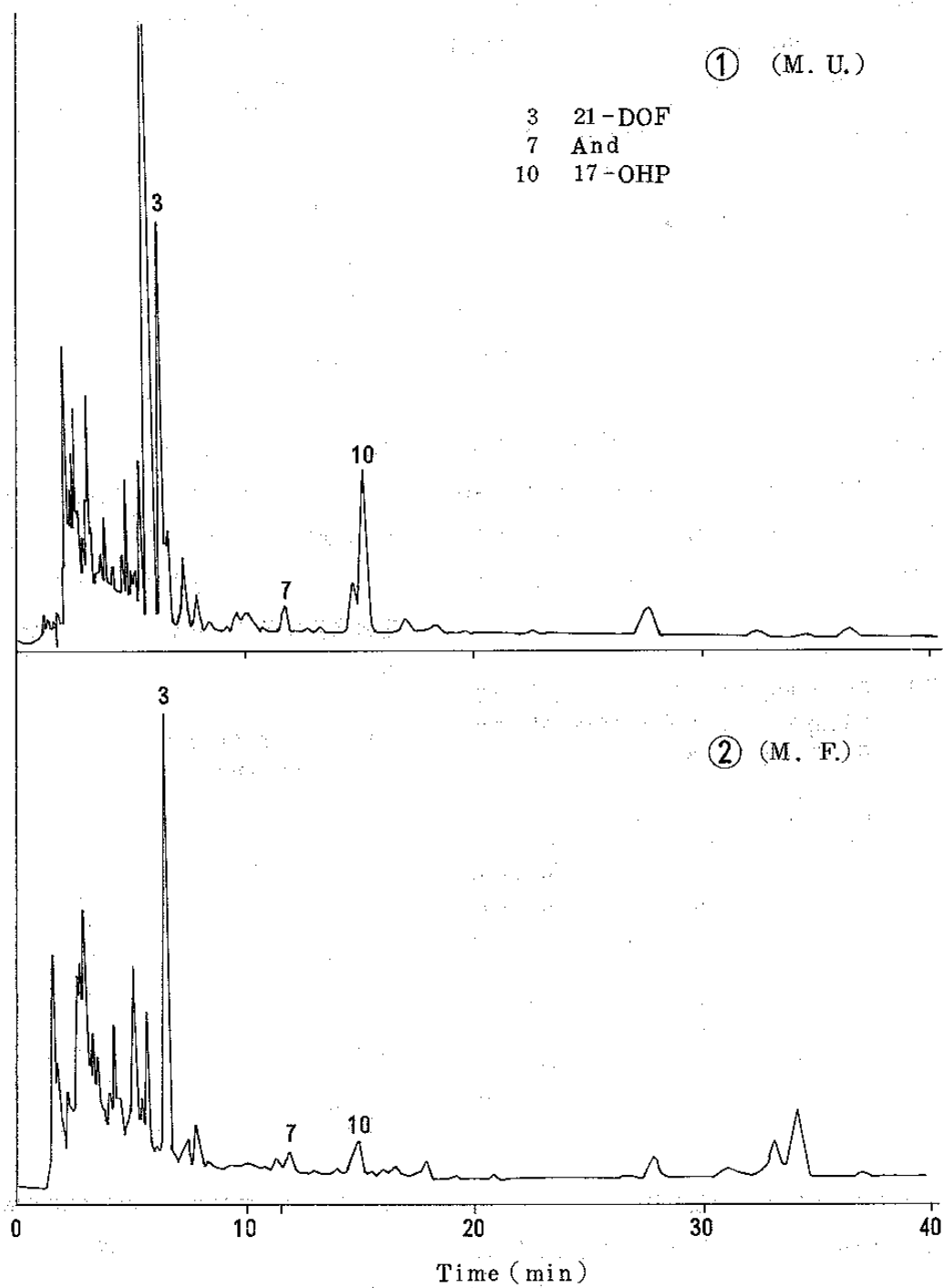


図2 CAH患児治療前のHPLCによる溶出パターン

- ① 症例1 (M. U.) 女児 生後10日
- ② 症例2 (M. F.) 女児 生後2日

められなかった。

表4 各種副腎皮質ステロイドホルモンの  
相対保持時間

		Rf (min)
Cortisone	(E)	4.4
Cortisol	(F)	4.9
Adrenosterone	(G)	5.0
16 $\alpha$ -hydroxytestosterone	(16-OHT)	5.1
21-deoxycortisol	(21-DOF)	6.3
11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione	(11 $\beta$ -OHAnd)	6.4
21-deoxycortisone	(21-DOE)	6.6
11 $\beta$ -hydroxytestosterone	(11 $\beta$ -OHT)	7.0
Corticosterone	(B)	7.3
11-deoxycortisol	(S)	7.7
16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	(16-OHP)	7.8
19-nor-testosterone	(19-NT)	10.8
Androstenedione	(And)	11.6
11-deoxycorticosterone	(DOC)	12.6
11 $\beta$ -hydroxyprogesterone	(11 $\beta$ -OHP)	12.8
Testosterone	(T)	13.7
17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	(17-OHP)	14.7
Progesterone	(P)	33.1

### 3-4 CAH患児の溶出パターン

CAHのマス・スクリーニングで発見された患児2例(M.U.(女児), M.F.(女児))の治療前の血清の溶出パターンを図2に示す。両者とも正常では検出限界以下であるが, 21-hydroxylase欠損で著増する17-OHP, 21-DOF, Andが検出された。

測定値は外部標準法によったが, 表5に示すように, HPLCによる17-OHP値とEIAによる17-

表5 CAHマス・スクリーニングで発見された患児の血清によるHPLCとEIAの測定値

Cases	Day after birth	HPLC			EIA
		17-OHP (ng/ml)	21-DOF (ng/ml)	And (ng/ml)	17-OHP (ng/ml)
1 M. U. (♀)	10	263	242	27	220
2 M. F. (♀)	2	34	260	15	39

-OHP値はよく一致しており, 両者ともよく測定されているものと思われた。

なお, 2例のCAH患者とも21-DOFが異常高値であり, 正常ではまったく検出されないことから21-hydroxylase欠損の診断に有効な指標であると思われる。

## 4 結 語

CAHの診断を目的としたHPLCによる血中副腎皮質ホルモンの測定法を開発し, CAHマス・スクリーニングで発見した2例の患児を測定した結果, 21-hydroxylase欠損で著増する17-OHP, 21-DOF, Andが検出された。EIAによる17-OHP測定で高値となったCAHの疑わしい患児に対するHPLCによる測定は17-OHP以外のステロイドホルモンの動態をも判断でき, より信頼あるスクリーニングとなることから, HPLCによる測定の有効性が認められた。

## 5 文 献

- 1) 吉田 久, 北川照男, 多田啓也, 中島博徳編 : "小児内分泌・代謝異常", P 93-107 (1977) 金原出版
- 2) O'Hare, M. J., Nice, E. C., Magee-Brown, R. and Bullman, H. : Journal of Chromatography, 125, 357-367 (1976)
- 3) 大西鍾寿, 松永智幸, 山路和彦, 宮沢玄治, 稲垣 浩, 藤掛守彦 : ホルモンと臨床, 24, 303-313 (1976)
- 4) 斎藤善蔵, 羽柴哲自, 宮本正治, 竹田亮祐 : 日内分泌誌, 53, 765-775 (1977)
- 5) 東條好伸 : 日本産科婦人科学会誌, 33, 117-126 (1981)
- 6) Scott, N. R. and Dixon, P. F. : Journal of Chromatography, 164, 29-34 (1979)