

羊水中の副腎皮質ホルモンの高速液体 クロマトグラフィーによる測定について

Amniotic Fluid Concentration of 44-3ketosteroids in the Human Fetus by High-Performance Liquid Chromatography

水嶋 好清 福士 勝 荒井 修
前田 博之 青木 襄 高杉 信男

Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi, Osamu Arai,
Hiroyuki Maeda, Minoru Aoki and Nobuo Takasugi

先天性副腎皮質過形成のハイリスク妊婦を対象に、胎児に対する当該疾患の診断可否を検討する目的で、予試験として、正常妊婦の各妊娠週数における羊水中の副腎皮質ホルモンの測定を行った。

1 方 法

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、血清を用いた前報¹⁾の方法に準じ、羊水 1 ml に内部標準 10 ng (10 μ l) を添加し、エキストレルートカラムに吸着させた後、ジクロロメタン 10 ml で溶出させて試料とした。HPLC 条件も血清による方法によった。

17-OHP-EIA は、羊水 10 μ l を 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.0 (PBS) で 200 μ l に希釈し、ジエチルエーテル 2 ml で抽出し、17-OHP 抗血清 ($\times 60$ 万倍) 400 μ l と第二抗体固相化ビーズ 1 個を入れて 1 夜放置後、17-OHP-HRP コンジュゲート ($\times 1$ 万倍) を 100 μ l 加えて、2 時間反応させた後洗浄し、ビーズに結合した HRP の酵素活性を HPPA-H₂O₂ による蛍光測定法により測定した。

プロゲステロン-RIA (第一ラジオアイソトープ研究所製) は、羊水 10 μ l を PBS で 500 μ l に希釈し、ジエチルエーテル 3 ml で抽出後、以下キット添付の方法により測定した。

コルチゾール-RIA (栄研 ICL 製) は、羊

水 50 μ l を PBS で 500 μ l に希釈し、ジクロロメタン 2.5 ml で抽出後、その 1 ml を試料として、以下キット添付の方法により測定した。

2 結果と考察

HPLC 分析では、副腎皮質ホルモン (10 種) のうち検出されたものは 17-OHP、プロゲステロン、コルチゾール、コルチゾンのみであり、コルチコステロン、11-デオキシコルチゾール、デオキシコルチコステロン、21-デオキシコルチゾール、44-アンドロステンジオン、テストステロンはすべて検出限界 (1 ng/ml) 以下であった。また、17-OHP-EIA、プロゲステロン-RIA、コルチゾール-RIA では、HPLC に比して高い測定値であった (表 1)。これは、EIA、RIA では、抗血清と他のステロイドとの間に多少の交差反応があり、そのために測定値を引上げる結果と思われる。

17-OHP、プロゲステロンは、妊娠週数が進むとともに減少するが、コルチゾールは増加する傾向にあった。この傾向は EIA、RIA でも同様

表1 妊娠週数による各測定値とその相関

妊娠週数	個数	HPLC				EIA		RIA	
		17-OHP (ng/ml)	プロゲステロン (ng/ml)	コルチゾール (μg/dl)	コルチゾン (ng/ml)	17-OHP (ng/ml)	プロゲステロン (ng/ml)	コルチゾール (μg/dl)	
16-20	49	1.46±0.41	31.1±11.4	0.46±0.32	12.8±4.7	3.34±0.87	45.7±15.0	0.97±0.35	
21-25	26	1.28±0.69	25.3±12.5	0.89±0.55	10.2±5.1	3.22±1.66	40.3±22.9	1.31±0.59	
26-30	8	0.51±0.49	24.5±9.1	0.98±0.32	7.9±3.0	1.93±0.90	30.1±12.9	1.16±0.37	
31-35	13	0.51±0.52	22.2±10.6	1.44±0.60	10.6±6.6	1.85±0.90	27.7±11.3	1.83±0.82	
36-40	5	0.42±0.39	18.5±6.5	1.16±0.45	10.3±2.8	1.72±0.41	23.9±7.9	1.59±0.57	
妊娠週数との相関		r=-0.318	r=-0.572	r=+0.635	r=-0.207	r=-0.454	r=-0.386	r=+0.505	

表2 HPLCとEIA, RIAとの相関

	個数	相関係数	回帰式
17-OHP	101	0.845	Y=2.43X-0.15
プロゲステロン	101	0.865	Y=1.77X-8.67
コルチゾール	101	0.824	Y=1.28X+0.22

X: HPLC, Y: EIA, RIA

の結果となった。このことは Garry L.ら²⁾の結果ともよく一致していた。なお、週数に対して危険率0.1%の範囲内で相関が認められた(表1)。

17-OHP, プロゲステロン, コルチゾールともにHPLCとEIA, RIA間に高い相関が認められた(表2)。なお、HPLCによる17-OHPの回収試験では、2~30ng/ml添加した15例について、回収率は100.8±6.9%と良好であった。

副腎皮質過形成では羊水中のコルチゾールが減少し、17-OHPや44-アンドロステンジオンなどが増加することから³⁾、HPLCによる測定は、これらの副腎皮質ホルモンを同時に測定できるほか、抗血清を用いた時に起る交差反応などがない点で優れた方法であると思われる。

なお、羊水を提供して頂いた北海道大学医学部産婦人科教室、藤本征一郎講師に深謝致します。

3 文 献

- 1) 水嶋好清他: 札幌市衛生研究所年報, 10: 72~77 (1982).
- 2) Garry L. et al: J. Clin. Endocrinol. Metab., 44, 934~938 (1977).
- 3) Pang S. et al: J. Clin. Endocrinol. Metab., 51, 223~229 (1980).