

Title	酵素法による尿中 3β -hydroxysteroids分画測定法の開発とその応用
Author(s)	山口, 賀久
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32412
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	山 口 貴 久
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 7 8 4 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 12 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	酵素法による尿中3β-hydroxysteroids 分画測定法の開発と その応用
論文審査委員	(主査) 教 授 宮 井 潔 (副査) 教 授 熊 原 雄 一 教 授 松 本 圭 史

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

尿中総17-ketosteroids (17-KS) の測定は下垂体—副腎皮質や性腺系疾患の臨床検査として広く行なわれているが、17-KS 高値を示す種々の副腎疾患の鑑別診断には、17-KS の分画定量が必要である。しかし従来から用いられてきたガスクロマイグラフィー法やカラムクロマトグラフィー法は高度で、かつ煩雑な手技を必要とし、一般臨床検査法として用いるには困難であった。そこで本実験では 3β -hydroxysteroid に対して特異的に反応する酵素である 3β -hydroxysteroid oxidase を使用することにより、 3β -hydroxysteroids 量の特異的に定量し得る方法を開発し、更に薄層クロマトグラフィーによって 3β -hydroxysteroids を分画し、その測定にも本酵素法を応用した。このように本法を用い、各種副腎疾患の尿中 3β -hydroxysteroids の測定を試み、鑑別スクリーニング法として有用であることを示唆する成績を得た。

〔方法ならびに成績〕

24時間尿のうちの一部尿を等量の石油エーテルで洗浄し、脱脂したものを試料とした。これらを β -glucuronidase の使用により、グルクロン酸抱合を水解し、次いでBurstein らの方法で solvolysis を行ない硫酸抱合を水解した。水解後、酢酸エチル層をアルカリ洗浄、水洗浄し、蒸発乾固の後、一部を 3β -hydroxysteroids 定量用、一部を 3β -hydroxysteroids 分画測定用、又一部は総17-KS 測定用に分けた。

酵素法による 3β -hydroxysteroids 測定の原理は B.sterolicum 由来の 3β -hydroxysteroid oxidase を 3β -hydroxysteroid に作用させ、生じた過酸化水素を peroxidase と phenol, 4-

aminoantipyrine によって quinoneimine dye を生成せしめ、比色定量するものである。本法の基礎的検討及び臨床応用成績は次の通りである。

(1) 尿中に排泄される 3β -hydroxysteroid は大部分が硫酸抱合型であり、酸水解法で行なうと遊離する 3β -hydroxy 基は変化をうけ約20%回収されるのみであった。従って硫酸抱合の水解は条件の緩和な solvolysis で行なった。

(2) 本法に用いた 3β -hydroxysteroid oxidase の特異性を重量百分率であらわすと、次の通りである。()内は薄層上での値を示す。

dehydroepiandrosterone 100% (100%), epiandrosterone 100% (65%), androstene- 3β , 17 β -diol 100% (57%), pregnenolone 75% (20%), 5-pregnenetriol 70% (50%), cholesterol 65% (20%以下), 16 α -hydroxydehydroepiandrosterone 44% (39%), androsta-5, 16-diene- 3β -ol 43%, pregnane- 3β , 20 α -diol 1%, 3α -hydroxysteroids は negligible であった。

(3) 3β -hydroxysteroid の標品として dehydroepiandrosterone を用いた場合、10~100 μ g/tube の間で原点を通る直線性のある検量線が得られた。

(4) 尿への androsterone 及び dehydroepiandrosterone の添加回収率は90~98%と良好であった。また三重測定による同時再現性をみると CV \pm 10%以内であった。

(5) 本法による年齢別 3β -hydroxysteroids 排泄量は2~13歳で、測定感度以下(N.D)~0.3mg/day, 14~45歳で、0.2~1.2mg/day, 46歳以上では、N.D~0.6mg/day であった。

(6) 総17-KS の増量をみた各種副腎疾患について、本法により 3β -hydroxysteroids を測定したところ種々の程度に増加し、adrenal virilizing tumor では、 3β -hydroxysteroids/17-KS 比を見ると60%以上であったのに対し、Cushing 症候群や21-hydroxylase 欠損症による adrenogenital syndrome などでは、その比は40%以下と異なることが示された。

[総括]

3β -hydroxysteroid oxidase の使用により、簡易に 3β -hydroxysteroids を定量し、また薄層クロマトグラフィーを行なったプレート上で、直接本酵素液を作用させることにより、 3β -hydroxysteroids の分画測定を可能にした。

本法は種々の基礎的検討により、臨床検査法としての条件を満たし、実際に臨床的に応用し、17-KS 増加を伴う副腎疾患を鑑別するスクリーニング法として有用であることを示唆する成績を得た。

論文の審査結果の要旨

本研究は 3β -hydroxysteroid に対し特異的に作用する 3β -hydroxysteroid oxidase を利用することにより、本分画を定量する巧妙な方法を開発したものである。そして種々な基礎検討から本法が特異性、感度、簡易度、再現性等、臨床検査として必要な諸条件を満たすことを確かめ、実際に臨床応用を試みると共に薄層クロマトグラフィー後のプレート上での定量にも応用可能なことを明らかにしたもので、臨床検査診断上価値ある研究と考える。