



Title	酵素法による尿中3 $\beta$ -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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32412">https://hdl.handle.net/11094/32412</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	山 口 貴 久
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4784 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	<b>酵素法による尿中<math>3\beta</math>-hydroxysteroids 分画測定法の開発とその応用</b>
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 $3\beta$ -hydroxysteroid に対して特異的に反応する酵素である $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase を使用することにより、 $3\beta$ -hydroxysteroids 量を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 $3\beta$ -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 $3\beta$ -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 $\beta$ -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 $3\beta$ -hydroxysteroids 定量用、一部を $3\beta$ -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 $3\beta$ -hydroxysteroids 測定の原理は *B.sterolicum* 由来の $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase を $3\beta$ -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  $3\beta$ -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  $3\beta$ -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  $3\beta$ -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- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol 100% (57%), pregnenolone 75% (20%), 5-pregnenetriol 70% (50%), cholesterol 65% (20%以下),  $16\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone 44% (39%), androsta-5, 16-diene- $3\beta$ -ol 43%, pregnane- $3\beta$ ,  $20\alpha$ -diol 1%,  $3\alpha$ -hydroxysteroids は negligible であった。

(3)  $3\beta$ -hydroxysteroid の標品として dehydroepiandrosterone を用いた場合、10~100  $\mu$ 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) 本法による年令別  $3\beta$ -hydroxysteroids 排泄量は 2~13歳で、測定感度以下(N.D)~0.3 mg/day, 14~45歳で、0.2~1.2 mg/day, 46歳以上では、N.D~0.6 mg/day であった。

(6) 総17-KS の增量をみた各種副腎疾患について、本法により  $3\beta$ -hydroxysteroids を測定したところ種々の程度に増加し、adrenal virilizing tumor では、 $3\beta$ -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]

$3\beta$ -hydroxysteroid oxidase の使用により、簡易に  $3\beta$ -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、 $3\beta$ -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 増加を伴な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  $3\beta$ -hydroxysteroid に対し特異的に作用する  $3\beta$ -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としたもので、臨床検査診断上価値ある研究と考える。