

第13群 診断・検査Ⅱ (婦人科) (81~89)

81. Gaschromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS) による血中 Estrogen 定量法

(昭和大)

菅野 寛, 岩井 政清, 橋野 正史

鈴木 仁一, 矢内原 巧, 中山 徹也

(帝国臓器・化研) 森 弘

(東京薬科大・薬品物理) 馬場 茂雄

目的: 血清中 Estrogen (Es) は, 従来種々の方法により測定されている. 我々は安定同位体を用いた内部標準物質としての Es 安定同位体を合成し Gaschromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS) を用い Mass Fragmentography (MF) を利用した血清中遊離 Estrone (E_1) Estradiol (E_2) Estriol (E_3) の定量法を開発した.

方法: 内部標準物質の合成法は, E_1E_2 または E_3 を 30% D_2SO_4 D_2O 存在下に CH_3OD と還流した後メタノールより再結晶して $2.4.16.16-d_4-E_1$, $2.4-d_2-E_3$ を得た. 血清に上記の内部標準物質を一定量あらかじめ添加した後メタノールにて抽出. n-ヘキサンにて脱脂後メタノールを溜去し酢酸エチルにて抽出する. 酢酸エチル, 無水トリフルオロ酢酸にて TFA 化または無水酢酸にてアセチル化する. そして GC-MS (島津 LKB 9000 MID-PM) にて測定する. ガラスカラム (1m, 1% OV-1 chromosorb w 60~80mesh), キャリアーガス (He 25 ml/min) 温度条件 (セパレーター270°C, カラム210°C, イオン源290°C) にて添加した一定量の安定同位体と標準 Es の MF 上におけるピーク比から血清中 Es 値を計算により定量した. 本法による測定に要する時間は約3時間で1日20検体測定できる.

成績: 本法による精度は $E_1E_2E_3$ の %recovery はそれぞれ 97.72 ± 1.89 , 97.45 ± 0.99 , 98.25 ± 1.52 coefficient of variation もそれぞれ 1.90, 1.30, 1.52 であり極めて良好な成績である. 測定感度は絶対注入量が 20pg 以上あれば可能である. また本法と我々の教室で行っている RIA 法の結果と相関係数は E_1 ($r=0.8491$), E_2 ($r=0.9271$), E_3 ($r=0.8701$) であつた. 妊婦 (120例) 血清中の Es 値は妊娠週数と共に増加 (妊娠10カ月では E_1 (19.76 ± 8.50 ng/ml), E_2 (37.73 ± 13.35 ng/ml), E_3 (16.49 ± 3.05 ng/ml) であつた.

独創点: 使用した内部標準物質が定量しようとする目的物質と同様の理化学的性質をしめすために抽出操作の

ロス自動的に補正されることになる. またその質量数より定量するために極めて特異性の高い測定法である.

82. ^{125}I 標識 estradiol を使用した estradiol の簡便な radioimmunoassay

(東京・第一ラジオアイソトープ研)

津島章一郎, 中沢 信彦, 小川 弘

婦人血中の estradiol- 17β (E_2) を ^{125}I 標識トレーサーを使用し, 且, カラム等によるクロマト操作に代る簡便な純化操作により, 正確に測定可能な assay system の開発を目的として検討を行つた.

方法: 300 μ l 前後の血清をエーテル抽出し, エーテル揮発後0.4ml の50%メタノールと1.0ml の n-ヘキサン間で分配 defatting する. n-ヘキサン除去後, メタノール溶液を揮発し, 緩衝液0.5ml, ^{125}I - E_2 -tyrosine 0.1 ml (ca. 2×10^4 cpm), 抗血清 (anti- E_2 -6 BSA) 0.1ml 添加後室温にて60~90分間インキュベートする. BF 分離は二抗体法を使用した.

成績: ステロイドの radioimmunoassay で従来使用されてきた tyrosine methyl ester 誘導体を標識し, トレーサーとして使用したところ血清抽出物の増加とともに非特異的吸着が異常に増加し, 使用に耐えなかつた. 本法ではその加水分解物である ^{125}I - E_2 -6-tyrosine をトレーサーとして使用した. 標準曲線は $Bo/T=60\%$, $(B/Bo) 90\%=10$ pg, $(B/Bo) 50\%=75$ pg となり感度は良好であつた. 50%メタノールと n-ヘキサンの間の液々分配操作では E_2 は定量的に50%メタノール層へ分配されるのが認められ, 本法の回収率は90~95%となつた. intra-および inter-assay 精度はそれぞれ5.5%, 8.0%となつた. 被検血清は500 μ l までは使用可能であり, 本法 (y) と Sephadex LH-20 カラム操作による方法 (x) ならびに Defatting 操作を省略し抽出のみの場合 (x) との相関性はそれぞれ $y=1.03x+7.0$ (pg/ml), $r=0.989$, $y=0.887x-34$ (pg/ml), $r=0.982$ となつた.

以上, 本法によつて求めた結果は従来の Sephadex LH-20カラムにより純化して求めた値と良く一致し, そして操作が簡便 (スピッツ, ピペッティング不要) なこと, 更にトレーサ核種として ^{125}I を使用していることにより臨床上充分応用しうるものと考えられる.

質問 (山口大) 伊東 武久

分子当りの Radioactivity が 3H より高いにもかかわらず