

高速液体クロマトグラフィーによる副腎・精巣 ステロイドの分析

— Δ^4 ステロイドを中心に—

川崎医科大学 泌尿器科

渡 辺 慶 太

(昭和62年2月27日受理)

Analysis of Adrenal and Testicular Steroids by High Performance Liquid Chromatography — A Preliminary Report of Determinations of Δ^4 -Steroids —

Keita Watanabe

Department of Urology, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 27, 1987)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、副腎・精巣ステロイド分析の予備的検討を行った。使用した HPLC システムは LC5A 型 (Shimazu) で UV detector と cosmosil packed column 5C₁₈ を接続した。progesterone, deoxycorticosterone, corticosterone, cortisol, testosterone の5種類のステロイドは明瞭に分離可能であり、直線の検量線を得ることができた。しかし近似した retention time のステロイドの分離は困難であった。平均回収率は 93.0% であり、このクロマトグラフィーシステムの限界感度は ng オーダーであった。

HPLC はヒト副腎および精巣ホモジネート組織、ならびにラット副腎細胞短期間培養浮遊液より抽出したステロイドの分離・同定・定量に有用であることが示唆された。

The analysis of adrenal and testicular steroids was preliminarily investigated using a high performance liquid chromatography (HPLC). This system was LC-5A type (Shimazu) and equipped with a UV detector and cosmosil packed column 5C₁₈.

The best condition for the separation of mixed steroids was investigated. Five steroids (progesterone, deoxycorticosterone, corticosterone, cortisol, testosterone) were sharply separated and obtained a linear calibration curve. Separations of similar retention time steroids were difficult. Mean percentage recovery was 93.0%. Sensitivity of the steroid determination was ng order at this chromatographic system.

HPLC was a useful tool for separation, identification, and quantitation of steroids that extracted from homogenized tissue of adrenal gland and testicular tissue in

human and isolated adrenal cells of rat, too.

Key Words ① High performance liquid chromatography (HPLC)
② Analysis of adrenal and testicular steroids

緒 言

副腎・精巣ステロイドホルモンの測定には、従来 competitive protein binding assay (CP-BA) や、radioimmunoassay (RIA) が広く行われてきたが、測定の煩雑さや測定時間、特異性の点で課題が残されている。¹⁾ そこで近年各種物質の迅速な分析・測定に応用されている高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) を用い、副腎・精巣ステロイド代謝を検討するための基礎的実験として、副腎・精巣ステロイドの分離・同定・定量化に関し予備的検討を行ったので報告する。

実験方法

まず、標準ステロイドを用い、HPLCによる至適分離条件を検討し、次いで、生体試料 (副腎・精巣) およびラット副腎細胞短期間培養浮遊液中のステロイドの分離・同定・定量を試みた。

1) 標準ステロイドおよび試薬

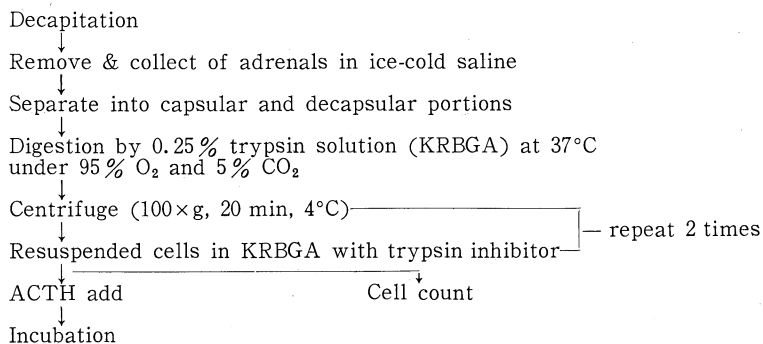
今回用いた標準ステロイドは、progesterone, deoxycorticosterone, corticosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, cortisone, testosterone の8種類でいずれも Shigma 社より入手した。これら標準ステロイドは特級 ethanol (和光純薬) に溶解し、10 ng/ml に調整した。試料の前処理には dichloromethane, HPLC 移動相には methanol, 蒸留水 (液体クロマトグラフ用, 半井化学) を用いた。

2) HPLC

HPLC の機種は LC-5A (Shimazu) で、カラムは cosmosil packed column 5C₁₈ (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm), カラム槽内温度 30°C で用いた。detector として UV 光度計, セル波長 240 nm を使用した。移動相は methanol/蒸留水 (80:20, V/V) に調整, 平均流速 1.0 ml/min に設定した。HPLC によるステロイドの回収率は、マイクロシリッジによる試料注入前後のステロイド量から求めた。ステロイド注入後分離され記録用紙に記録されるパターンをみながら単離ステロイドのピークに一致した溶出液を採取, N₂ ガス下で乾固のち残渣を移動相溶液で再溶解後 HPLC に再充填し注入前値と比較した。なお, retention time, peak-height, 面積比等の処理は CR-3 クロマトパック (Shimazu) に接続し, 自動計算で求められるよう設定した。

3) 副腎・精巣組織中からのステロイド抽出
腎細胞癌で radical nephrectomy 時に採取した副腎組織の一部を用い, 細切, 超音波破壊 (BRANSON SONIFIER®) 後 8~10 倍量の dichloromethane でステロイドを抽出し,

Table 1. Procedure for the preparation of the cells isolated from the rat adrenals.



(M. Matsuki,²⁾ 1984)

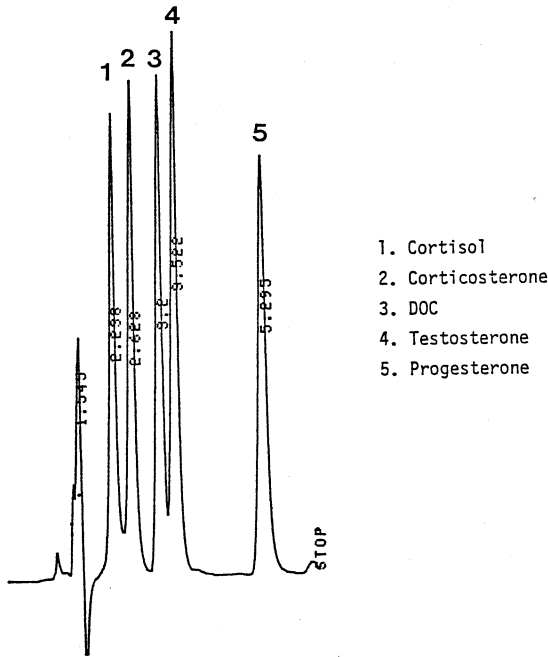


Fig. 1. Separation of the five standard steroids by HPLC.

0.1 mol/l NaOH 1 ml および 蒸留水 1 ml で 2 回 洗 浄 後, 窒 素 ガ ス プ ロ ー イ ン グ に よ り 濃 縮, 200 μ l の methanol に 再 溶 解 し う ち 10 μ l を HPLC に 充 填 し た.

精 巢 組 織 は, 前 立 腺 癌 患 者 の 抗 男 性 ホ ル モ ン 療 法 と し て 摘 出 し た 精 巢 を 用 い, 副 腎 と 同 様 の 操 作 の の ち HPLC に 供 し た.

4) ラット副腎細胞培養浮遊液の作製

松木ら²⁾の方法に準じて行った(Table 1). 副腎束状層・網状層を被膜より分離し, 37°C 恒温槽内で 95% O₂, 5% CO₂ の混合ガス下に 0.25% trypsin を混ぜた KRBGA (Krebs-Ringer bicarbonate buffer + 0.2% glucose + 0.5% BSA) で digestion し た の ち, 遠 沈 (100 \times g, 20 min, 4°C), 洗 浄 し 副 腎 細 胞 浮 遊 液 を 得 た. こ れ よ り 1 \times 10⁵ 個 の 細 胞 を 採 取, 1 ~ 2 倍 量 の ethanol で 抽 出, 窒 素 ガ ス プ ロ ー イ ン グ で 乾 固 濃 縮 し, 200 μ l の methanol に 再 溶 解 後, う ち 10 μ l を HPLC に 注 入 し た.

結 果

1) 分離能・再現性

cortisol (F), corticosterone (B), deoxycorticosterone (D-OC), testosterone (T), progesterone (P₄) の 5 種 の 標 準 ステロイド混液 25 μ l を HPLC に 充 填 し た と き の パ タ ー ン よ り, 注 入 し た 5 種 の ステロイド は 明 瞭 な 分 離 が 可 能 で あ り, 良 好 な 再 現 性 が 得 ら れ, 5 回 の 注 入 実 験 で 各 ステロイド の peak-height 比, 面積比はほぼ一定に保たれた (Fig. 1).

2) 検量線

標準 testosterone を 各 々 50 ng, 100 ng, 150 ng, HPLC に 充 填 し た 分 離 パ タ ー ン は, 注 入 量 に 比 例 し た UV 吸 光 度 が み ら れ (Fig. 2), 同 様 に

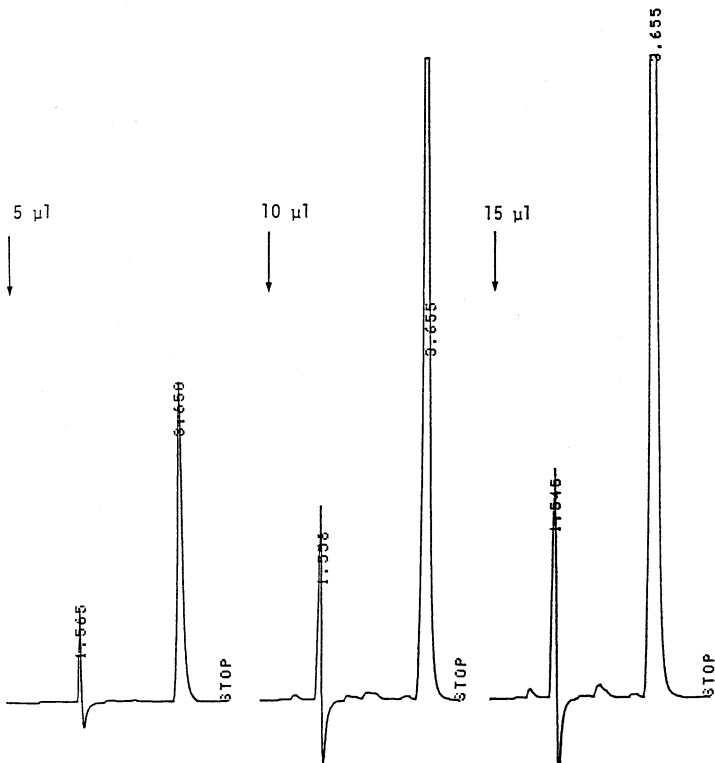


Fig. 2. Testosterone injected to the HPLC in concentrations of 5 μ l (50 ng), 10 μ l (100 ng) and 15 μ l (150 ng).

cortisol (F), corticosterone (B), progesterone (P₄) のステロイド溶液 50, 100, 150 ng を充填し UV 吸光度をスポットすると、直線の検量線が得られた (Fig. 3).

3) 検出時間 (retention time)

今回用いた標準ステロイド progesterone, deoxycorticosterone, corticosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, cortisone, testosterone, それぞれ 50, 100, 150 ng を 5 回ずつ HPLC に注入し、計 15 回測定時の平均値で retention time を示した (Table 2). peak-height までの最短時間は cortisone の 2.08 分 (2 分 4 秒 8) から最長時間は progesterone の 5.31 分 (5 分 18 秒 6) と非常に短時間で分離可能であった。

4) 回収率

各種ステロイドの retention time 相当部のキャリアー液を分取し、乾固後、移動相溶液に再溶解し HPLC に充填、注入前値との比を算出した (Table 3). detector とキャリアー液排出部は細管で接続され、記録用紙に描記される peak-height とは若干のずれが生じるが、その時間差の補正は容易であった。回収率は 86.0~97.3%, 平均 93.0%, CV は 0.9~2.5%, 平均 1.7% であった。

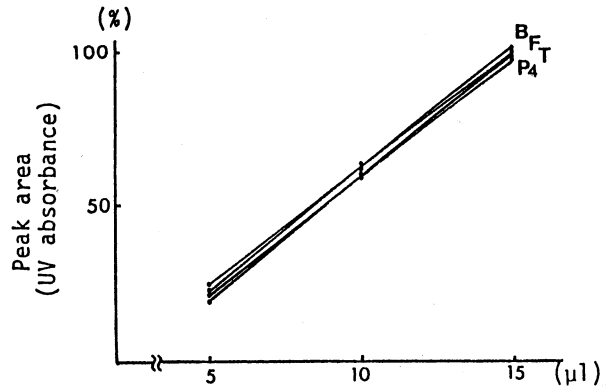


Fig. 3. Calibration curves of the four steroids (B, F, T, P₄).

Table 2. Retention times of the eight steroids.

Corticoids	Retention time (min)
Progesterone	5.31±0.01
17-OH-Prog.	3.50±0.01
Testosterone	3.65±0.02
DOC	3.20±0.01
B	2.64±0.01
S	2.61±0.01
F	2.24±0.01
E	2.08±0.01

DOC: 11-Deoxycorticosterone

B: Corticosterone S: 11-Deoxycortisol

F: Cortisol E: Cortisone

Table 3. Recovery studies of the eight steroids.

Steroids	Expected Dose (μg/ml)	Recovery Dose (μg/ml)	% Recovery (%)	SD (μg/ml)	CV (%)
Progesterone	10.0	8.60	86.0	0.5	0.9
17-OH-Prog.	10.0	9.07	90.7	1.2	1.0
Testosterone	10.0	9.73	97.3	1.5	1.9
DOC	10.0	9.51	95.1	1.7	1.4
B	10.0	9.38	93.8	2.3	2.5
S	10.0	9.19	91.9	1.9	2.2
F	10.0	9.37	93.7	1.4	1.6
E	10.0	9.52	95.2	0.5	1.7
Mean	10.0	9.30	93.0	1.4	1.7

DOC: Deoxycorticosterone B: Corticosterone S: 11-Deoxycortisol F: Cortisol

E: Cortisone

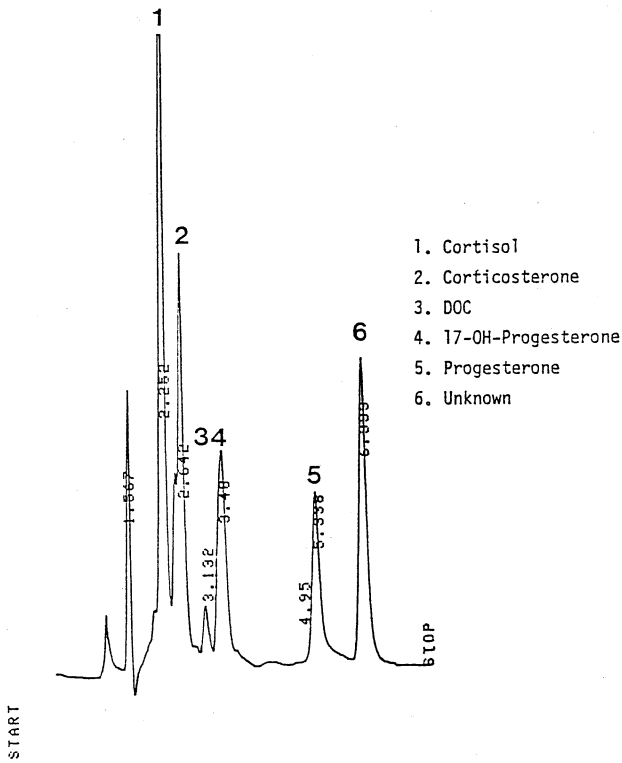


Fig. 4. Separation of the steroids in human adrenal tissue by HPLC.

5) 試料からのステロイド測定

(1) ヒト副腎組織中ステロイドの分離パターン

腎細胞癌で radical nephrectomy 施行時採取した副腎組織の一部を, dichloromethane でステロイド抽出後 HPLC に供した. 分離された corticosteroids のパターンをみると注入直後にみられる2つの UV 吸収ピークは夾雑物によるもので, それぞれの corticosteroids は, ステロイド標品を内部標準として添加したのち同様の処理を行い, 分離パターン, peak retention time の一致により同定された (Fig. 4).

(2) ヒト精巣組織中ステロイドの分離パターン

精巣組織は前立腺癌の抗男性ホルモン療法として施行した除辜術により得た精巣を測定まで -20°C に保存していたものを用いた. 細切, 超音波破碎ののち dichloromethane でステロ

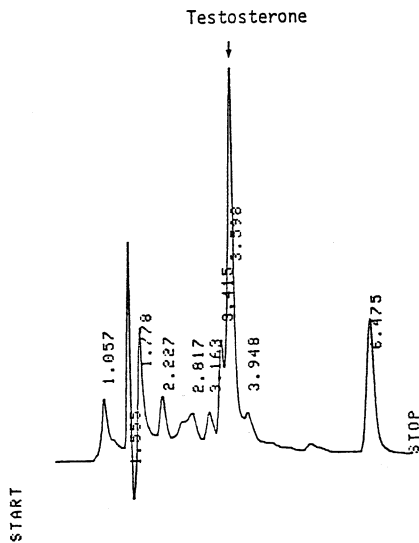


Fig. 5. Separation of the steroids in human testicular tissue by HPLC.

Isolated adrenal cells of rat (stimulated ACTH)

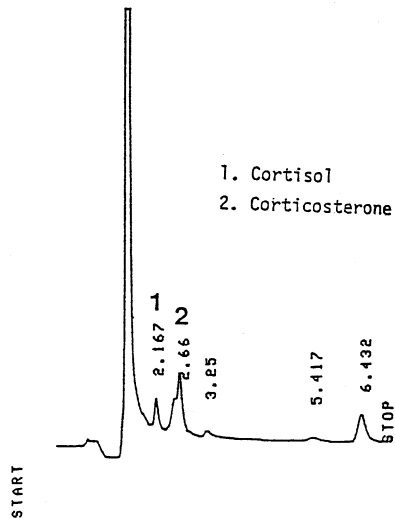


Fig. 6. Separation of the steroids in isolated adrenal cells of rat by HPLC.

イドを抽出し HPLC に供した。精巢ステロイドの分離パターンをみると (Fig. 5), 内部標準で同定された testosterone 以外に多数の未同定ピークが得られ, 今後の検討を要した。

(3) ラット副腎細胞浮遊液中ステロイドの分離パターン

ラット副腎細胞浮遊液 (1×10^5 個) 中のステロイドを1~2倍量の ethanol で抽出, 乾固後 methanol に再溶解し HPLC に供した。control の副腎細胞浮遊液では十分なピークは得られなかったが, ACTH (1.11×10^{-9} M) 2時間負荷によるラット副腎細胞浮遊液では cortisol, corticosterone の同定が可能であった (Fig. 6)。

考 按

HPLC は試料の前処理が比較的簡単で, しかも効率よく分離しうるクロマトグラフィーとして広く応用されており, 分離能・回収率・再現性・労力などの点で従来のガスクロマトグラフィーやカラムクロマトグラフィーよりもすぐれているとの報告がある。^{3), 4)} しかし定量には detector として UV photometer を使用するため, 試料中に混在する他のステロイドや, あるいは夾雑物の干渉等により高値を示したり, retention time に若干のずれを生じる危険性がある。¹⁾ 今回生体試料からのステロイド抽出は Weisman, Y. ら,⁵⁾ Saito, Z. ら,⁶⁾ 喜田ら⁷⁾ の方法に準じて行い, 試料測定に際し他の不純物・夾雑物等の混入をできる限り避けるため十分に注意したが, retention time に若干の誤差を生じた。しかしその補正は容易であった。

HPLC の限界感度は 5~10 ng とされているが,³⁾ 著者も同様の印象を受けた。斉藤ら⁴⁾ は, 分離しようとする物質の種類に応じてキャリアー液の組成やカラム内容を吟味し, また detector のセル構造を改良したもので感度 204 pg と高感度が得られたと述べている。しかしながら HPLC の限界感度以下の微量ステロイド濃度を測定するには, 現状ではやはり

CPBA や RIA の応用が必要と思われる。このとき適当な内部標準を選び, HPLC に供し, 検出感度以下の濃度成分を分取することで特異性の高い RIA となり得ることがいわれている。^{3), 4)} また RIA と HPLC 測定値の間には良好な相関を示すことも報告されている。^{8), 9)}

HPLC の分離能向上のためには適切なカラムとキャリアー液組成が重要で,¹⁰⁾ 今回の実験でも retention time の近似したステロイドの分離は, いまだ十分とは言えず吟味を要すると思われた。近似した極性のステロイドをいくつか含んだ試料の分析において竹田ら¹¹⁾ は, Sep-pak C18-cartridge による HPLC 試料の前処理を推奨している。Sep-pak C18-cartridge は混入物の多い試料から特定物質を効率よく分離する前処理法として有用で, よりシャープなピークが得られるとしている。

HPLC による回収率は, 文献上 78.0%¹²⁾ ~ 100.2%¹³⁾ の値が報告されている。今回の成績は HPLC に充填してから分取するまでの回収率は 93.0% で諸家の報告^{3), 4), 6)} と差をみなかった。

生体試料の測定として, ヒト副腎・精巣組織ホモジネート, ラット副腎遊離細胞による短期間培養を行った。このうち副腎細胞培養は, 動物の個体差を除去しうること, in vivo での種々の因子を取り除き単純な系での検討が可能なこと, 定量的な検討が容易であること, 均一な細胞集団が得られること, 細胞表面に直接反応液が作用し感度の高い系が得られることなどの利点を有している。^{14), 15)} 自験のラット副腎遊離細胞短期間培養液中ステロイド測定の成績は, ACTH 負荷によりホルモン活性を高めたときに, cortisol, corticosterone の明瞭なピークが得られた。これはコントロールの副腎遊離細胞において HPLC で測定可能な内分泌活性を有する細胞の不足と推測している。

HPLC の装置は高価で, 極微量濃度の物質測定には限界感度があり, 場合によっては RIA 等によらねばならない現状ではある。しかし比較的簡単な前処理で迅速に, シャープに分離でき, かつ再現性, 回収率もすぐれている利点が

ある。さらに直線の検量線が得られ定量性も確認された。目的とするステロイドに応じ、適切なカラム、キャリアー液の検討等により一層短時間で高純度のステロイド分析が可能になると思われる。今後は HPLC による副腎・精巣ステロイドの一斉分析 (Δ^5 ステロイドを含む)、および薬剤負荷によるステロイド代謝に応用する予定である。

結 語

1) HPLC による副腎・精巣ステロイドの分析を行い、短時間でシャープに分離・同定することができ、再現性・回収率においても良好な結果であった。

2) 近似した極性のステロイド分析については、カラム充填剤、キャリアー組成を再吟味する必要があると思われた。

3) 検量線は直線を描き、検出感度は 5~10 ng であった。

4) 生体試料の分析において基線を安定化させるために、また正確な分離・同定・定量を行うために夾雑物の混入等に十分留意する必要がある。

5) HPLC による副腎・精巣ステロイドの分析は、その代謝を検討するうえで重要な細胞培養にも十分応用できる可能性を得た。

本実験に際し御指導、御校閲を賜りました川崎医科大学泌尿器科学教室 田中啓幹教授に感謝の意を表します。また実験の実施にあたり、常に適切な御指導をいただいた川崎医科大学内分泌内科学教室 松木道裕講師に深謝いたします。さらに HPLC の使用に御援助、御便宜いただきました川崎医科大学核医学教室 森田陸司教授、古川高子研究補助員に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 屋形 稔, 中村二郎: ステロイドホルモン分離法, 測定法の進歩 概論. 日臨 39: 191-203, 1981
- 2) Matsuki, M., Nishida, S., Kashiwa, Y., Horino, M., Yoneda, M., Endoh, M., Sato, A. and Oyama, H.: Steroidogenesis in isolated adrenal cells of rat. *Kawasaki med. J.* 10: 225-228, 1984
- 3) 斉藤善蔵, 羽柴哲自, 宮本正治, 竹田亮祐: 高速液体クロマトグラフィーによる corticoids の分析 第1報 血漿 corticosterone 測定法の吟味. 日内分泌会誌 53: 765-775, 1977
- 4) 斉藤善蔵, 天津栄子, 小野ツルコ, 一二三宣秀, 水毛生直則, 羽柴哲自, 坂戸俊一, 宮本正治, 竹田亮祐: 高速液体クロマトグラフィーによる コルチコイドの分析 第2報 合成ステロイド剤服用者の血液および尿中ステロイドの分離. 日内分泌会誌 55: 1296-1306, 1979
- 5) Weisman, Y., Bar, A., Spirer, Z. and Golander, A.: Rapid diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 138: 1-8, 1984
- 6) Saito, Z., Minoh, N., Hifumi, S. and Takeda, R.: Analysis of corticosteroids in human adrenal tissue by high pressure liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 131: 239-246, 1983
- 7) 喜田知子, 石丸勝雄, 斉藤史郎: 高速液体クロマトグラフィーによる血清および尿中副腎皮質ステロイドの分画測定. 臨病理 14: 662-669, 1981
- 8) 竹田亮祐, 斉藤善蔵, 一二三宣秀: 高速液体クロマトグラフィーの臨床応用. 日臨 39: 191-203, 1981
- 9) Stoner, E., Loche, S., Mirth, A. and New, M.I.: Clinical utility of adrenal steroid measurement by high performance liquid chromatography in pediatric endocrinology. *J. Chromatogr.* 374: 358-362, 1986
- 10) Kessler, M. J.: High performance liquid chromatography of steroid metabolites in the pregnenolone and progesterone pathways. *Steroids* 39: 21-32, 1982
- 11) 竹田亮祐, 斉藤善蔵, 越田英夫, 宮森 勇: ステロイドホルモンの分析: 最近の知見—高速液体クロマトグラフィー (HPLC)—. 日臨 42: 134-139, 1984

- 12) Trefz, F. K., Byrd, D. J. and Kochen, W.: Quantitative determination of cortisol in human plasma by high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 107: 181—189, 1975
- 13) King, R. H., Grady, L. T. and Reamer, J. T.: Progesterone injection assay by liquid chromatography. *J. pharm. Sci.* 63: 1591—1596, 1974
- 14) 鎮目和夫, 井村裕夫, 矢内原昇: 内分泌実験講座 3. 鎮目和夫, 對馬敏夫編: 内分泌細胞実験法. 東京, 講談社. 1982
- 15) O'hare, M. J., Nice, E. C., Magree, B. R. and Bullman, H.: High-pressure liquid chromatography of steroids secreted by human adrenal and testis cells in monolayer culture. *J. Chromatogr.* 125: 357—367, 1976