

学 位 論 文 題 名

A direct enzyme immunoassay for 18-hydroxycortisol in urine:
a new tool for screening primary aldosteronism

（尿中18-ヒドロキシコルチゾル直接酵素免疫測定法：
原発性アルドステロン症のスクリーニングのための新しい方法）

学位論文内容の要旨

I 緒言

原発性アルドステロン症は副腎皮質腺腫を原因として高血圧、低カリウム血症を主徴とする疾患である。膨大な高血圧症患者の中から本症患者をスクリーニングすることは困難であるため、簡便で信頼できるスクリーニング法の開発が求められてきた。1982年、Chu と Ulick により原発性アルドステロン症患者尿中に発見された 18-ヒドロキシコルチゾルは、分子内にグルココルチコイドの特徴である 17α -水酸基とミネラルコルチコイドの特徴である 18-水酸基を含む点でユニークであり、ハイブリッドステロイドとも呼ばれる。18-ヒドロキシコルチゾルが原発性アルドステロン症の良いマーカーであることが内外から報告され、本物質によるスクリーニングの可能性が開かれた。しかし、18-ヒドロキシコルチゾルの測定法には、ガスクロマトグラフィ-マススペクトロメトリー、液体クロマトグラフィ-、ラジオイムノアッセイが報告されているのみで、大量検体の自動処理に適した測定法は得られていなかった。今回著者は、尿中 18-ヒドロキシコルチゾルの直接酵素免疫測定法を開発し、原発性アルドステロン症患者について検討をおこなった。

II 実験方法

1. 18-ヒドロキシコルチゾルの化学合成

18-ヒドロキシコルチゾルの化学合成には、古くから知られているアルドステロン合成法の応用が報告されているが、これは毒性の強い気体（ニトロシルクロライド）を用いる方法であるため一般の実験室でおこなうことは困難である。そこで著者は、ヨウ素と四酢酸鉛を用いる安全なトランスアンニュラー光化学置換反応による新規合成法を開発し、18-ヒドロキシコルチゾル（18,20-ヘミアセタール型）の標品を得た。

2. 抗原および抗体の作製

18-ヒドロキシコーチゾルの3-(O-カルボキシメチル)オキシム誘導体を合成し、カルボジイミド法によりこれを牛血清アルブミンに結合させて免疫原とした。ウサギから得た抗血清からIgG画分を分離し、これを活性エステル法によりビオチン化して酵素免疫測定に用いた。抗体の特異性の検討には、16種のステロイド化合物について本酵素免疫測定法による抑制試験をおこない、酵素標識ステロイドの抗体への結合が50%抑制される化合物の濃度から交差率を求めた。

3. 酵素標識ステロイドの作製

18-ヒドロキシコーチゾルの3-(O-カルボキシメチル)オキシム誘導体から、パラニトロフェノールエステルを合成した。このものは活性エステルであるので、穏やかな条件（中性、4℃）で西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させることができた。

4. 緩衝液

マイクロプレートへのアビジンの固定化、洗浄、ブロッキング、希釈などの操作には、100 mg/l チメロサルを含むリン酸緩衝食塩水（pH 7.0）を用いた。洗浄には0.1% (v/v) Tween 20を、ブロッキングには1 g/l ウシ血清アルブミンを加えてそれぞれ使用した。希釈には、0.1% (v/v) Tween 20と1 g/l ウシ血清アルブミンの両者を添加した。

5. 酵素免疫測定

尿試料をビオチン化抗体および酵素標識ステロイドとガラス試験管内で反応（室温、2時間）させ、反応液の一部をアビジン固定化96穴マイクロプレートに移してB/F分離をおこなった（室温、1時間）。洗浄後、固相の酵素活性をo-フェニレンジアミンを用いる比色法で測定した。標準物質には、18-ヒドロキシコーチゾルのメタノール溶液（1 mg/ml）を-60℃で保存し、用時希釈して使用した。

6. 対象

手術により確認された原発性アルドステロン症患者（術前8，術後7）の副腎摘出術前後の24時間尿の一部を測定まで-60℃で保存して使用した。コントロールには、無作為に抽出した北海道大学医学部附属病院入院患者（n=40，男：女=20:20）の24時間尿の一部を用いた。

III 結果

1. 標準曲線

標準曲線は0.25-10 ng/wellの範囲で直線性を示し、プール尿の希釈曲線は標品のそれと平行関係にあった。

2. 再現性と回収率

2種類の尿試料 (0.80 mg/l と 0.38 mg/l) の測定内変動係数は、それぞれ、8.8% と 5.5% であった (n=27) . コントロール尿 (1 ml) に 50 ng と 300 ng/ml の標品を添加して 8 回測定して得た測定間変動係数は、それぞれ、8.2% と 7.8% であり、回収率はそれぞれ、86-101% (平均 92%) と 94-108% (平均 103%) であった.

3. 特異性

18-ヒドロキシコーチゾンと軽度 (11%) の交差を認めた以外は、交差反応を認めなかった.

4. 尿中 18-ヒドロキシコーチゾル排泄

コントロール群における 18-ヒドロキシコーチゾルの1日尿中排泄量は 26 - 696 nmol/l (325±206 nmol/l, mean±SD) であった. 原発性アルドステロン症 (術前) では 836 - 7460 nmol/l (2526±1492 nmol/l) とコントロール群より有意に高く ($p<0.001$), コントロール群から良好に分離された分布を示した. 術後患者群 (135-386 nmol/l, 254±93 nmol/l) はコントロール群と差がなかった. 18-ヒドロキシコーチゾルの絶対濃度 (nmol/l) あるいはクレアチニン補正濃度 (nmol/g creatinine) の比較でも, 原発性アルドステロン症患者 (術前) は術後患者群やコントロール群から良好に分離された.

IV 考察

迅速性 (4 時間以内), 再現性, 感度, 特異性において優れた尿中 18-ヒドロキシコーチゾルの酵素免疫測定法を確立した. 今回の検討では, 原発性アルドステロン症患者 (術前) の尿中 18-ヒドロキシコーチゾル排泄量はコントロール群や術後患者群のそれよりも著しく高値であり, 報告されている他法による測定結果とほぼ一致していた. 18-ヒドロキシコーチゾルは, 特発性アルドステロン症 (両側副腎皮質過形成) や二次性アルドステロン症では低いレベルにとどまることが知られているので, 原発性アルドステロン症のスクリーニングのためのマーカーとして非常に有用である. また, 先天性疾患であるグルココルチコイド反応性アルドステロン症では, 原発性アルドステロン症よりも更に大きい 18-ヒドロキシコーチゾルの尿中排泄を示すことが見いだされており, この場合も本物質によるスクリーニングが可能である. 著者は既に, 本法を改変して, 乾燥濾紙尿を試料として全自動分析装置上でおこなう酵素免疫測定法を確立することにより大量検体の処理を可能にしている.

V 結語

- 1) 尿中 18-ヒドロキシコーチゾルの酵素免疫測定法を開発した.
- 2) 原発性アルドステロン症患者では尿中 18-ヒドロキシコーチゾル排泄は著しく増

加していたが、副腎摘出術後はコントロールレベルまで低下した。

- 3) 尿中 18-ヒドロキシコルチゾルの酵素免疫測定による原発性アルドステロン症のスクリーニングが可能である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 石 橋 輝 男

学 位 論 文 題 名

A direct enzyme immunoassay for 18-hydroxycortisol in urine:
a new tool for screening primary aldosteronism

(尿中18-ヒドロキシコチゾル直接酵素免疫測定法：
原発性アルドステロン症のスクリーニングのための新しい方法)

原発性アルドステロン症は副腎皮質腺腫を原因として、高血圧、低カリウム血症を主徴とする疾患で、本症は全高血圧症の約1%に見られ、若年性高血圧症に限定すると7%に至ると考えられている。本症の診断は一連の複雑な内分泌学的検査に加え画像診断など他の検査が必要である。本研究は原発性アルドステロン症の尿に18-ヒドロキシコルチゾールという、分子内にグルココルチコイドの特徴である 17α -水酸基とミネラルコルチコイドの特徴である18-水酸基を合わせ持つ、いわゆるハイブリッドステロイドが多量に出ることに注目し、これを簡便に測定して原発性アルドステロン症のスクリーニングを行う系の開発を試みたものである。

方法：18-ヒドロキシコチゾールは著者らが新しく開発したヨウ素と四酢酸鉛を用いるトランスアンニュラー光化学置換反応法によりコチゾールから新規化学合成した。これをハプテンとし、牛アルブミンに結合後、兎に免疫し抗血清を作製した。測定系はペルキシダーゼ標識18-ヒドロキシコルチゾールを競合抗原とする競合法を採用し、標準物質は18-ヒドロキシコチゾルのメタノール溶液(1mg/ml)を -60°C で保存し、用時希釈し使用した。対象として手術により確認された原発性アルドステロン症の術前、術後の24時間尿の一部を -60°C で保存して用いた。コントロールには、無作為に抽出した北海道大学附属病院入院患者(n=40, 男:女=20:20)の24時間尿の一部を用いた。

結果：

1. 標準曲線は0.25ngから10ng/wellの範囲で直線性を示し、十分な測定感度であった。
2. 本法の再現性(測定間変動係数=C.V)は8.2-7.8%、18-ヒドロキシコチゾル添加回収率は92-103%と満足すべきもだった。
3. 抗体の特異性は18-ヒドロキシコチゾンと11%の交差を認めたが、他の15種の

類似物とは交差しなかった。なお、18ヒドロキシコーチゾンは尿中にはほとんど分泌しないため、測定には問題はない。

4. 尿中18-ヒドロキシコーチゾルは患者の術前値は明らかに高く、術後は正常人の値を示し、患者と正常人の分離が良好に出来た。
5. スクリーニングのため本測定法の自動化を完成し、さらにサンプル採取の簡便化のため濾紙尿での測定が可能である事を確認した。

本研究は原発性アルドステロン症の尿に出るハイブリッドステロイドの18-ヒドロキシコルチゾルに着目し、これを化学合成し、その抗体を作製後、原発性アルドステロン症のスクリーニングのための簡便な酵素免疫測定法を開発し、さらにそれを発展させ、その自動化と濾紙尿による測定法を確立したものである。18-ヒドロキシコーチゾルの尿中排泄は特発性アルドステロン症（両側副腎皮質過形成）や二次性アルドステロン症では低値を示すことから、本法は高血圧症に潜む原発性アルドステロン症の早期発見と類似疾患の鑑別を可能にした。原発性アルドステロン症が手術による腺腫の摘出で治療が可能であるのに対し、特発性アルドステロン症の多くは手術による副腎垂全摘は無効である。また両者の鑑別は容易ではない。従って本法は特発性アルドステロン症における無用な手術の施行を防げる意味で患者に福音をもたらす。また先天性グルココルチコイド反応性アルドステロン症では原発性アルドステロン症よりも更に高い尿中排泄を示すことが見いだされており、この疾患のスクリーニングも可能である。

以上、本研究は18-ヒドロキシコーチゾルを新規化学合成し、その抗体作製、酵素免疫学的測定法を開発し、原発性アルドステロン症およびグルココルチコイド反応性アルドステロン症のスクリーニングを可能としたもので、論文内容はオリジナリティが高く、博士（医学）に値すると判定いたしました。