

## <測定法>フリーE? リアパックによる妊婦血中 unconjugated oestriol 値の検討

著者	豊田 長康, 村田 和平, 松本 隆史, 杉山 陽一
雑誌名	ホルモンと臨床
巻	27
号	12
ページ	1435-1441
発行年	1979-12-01
その他のタイトル	Measurements of unconjugated oestriol levels in pregnancy with Free E? RIA Pack
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10076/2651">http://hdl.handle.net/10076/2651</a>

フリー E<sub>3</sub> リアパックによる妊婦血中 unconjugated oestriol 値の検討

豊田長康 村田和平  
松本隆史 杉山陽一

## —測定法—

フリー E<sub>3</sub> リアパックによる妊婦血中 unconjugated oestriol 値の検討

豊田長康\* 村田和平\*  
松本隆史\* 杉山陽一\*

## はじめに

妊婦における oestriol (以下 E<sub>3</sub> と省略) 測定は、今日、胎児胎盤機能検査法のなかで、最も信頼しうるものの1つとされている。特に尿中 E<sub>3</sub> 測定は、HAIR 法などによる簡易測定法の出現以来、産科临床上広く使用され、周産期管理の面で、欠かすことのできない検査法となりつつある。

一方血中 E<sub>3</sub> 測定は、化学的測定法の時代を経て、Tulchinsky et al. (1971), Gurpide et al. (1971)<sup>2)</sup> らの報告以来、もっぱら RIA 法により行われるようになり、total E<sub>3</sub> ならびに unconjugated E<sub>3</sub> の胎児胎盤機能検査法としての有用性が数多く報告されているが、測定操作に簡易さを欠くなどの理由で、日常臨床に広く使用されるに至っていない。

その後、Den ら (1973)<sup>3)</sup>, Katagiri ら (1974)<sup>4)</sup> などにより、E<sub>3</sub> に対する特異性の高い抗体を用いた RIA が開発され、chromatography による分離操作が省略できるようになった。しかし、一部の E<sub>3</sub> 抱合体と交叉反応があるため、conjugated E<sub>3</sub> と unconjugated E<sub>3</sub> を分離する、ether などによる抽出操作を省略することはできなかった。

今回、私どもは、従来に比しさらに特異性の高い抗体を用いることにより、抽出操作をも省略し、direct に血中 unconjugated E<sub>3</sub> を測定できる RIA kit (フリー E<sub>3</sub> リアパック、英国 The Radiochemical Centre 製、科研化学取り扱い) を使用する機会を得たので、正常妊婦ならびに異常妊婦を対象に、基礎的、臨床的検討を加えた。

## 1. 測定方法と対象

今回使用した血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定用 RIA kit (フリー E<sub>3</sub> リアパック) の組成は、(1) <sup>125</sup>I-E<sub>3</sub> 溶液、(2) 抗 E<sub>3</sub> 血清、(3) 凍結乾燥標準血清、(4) 硫酸アンモニウム溶液、である。凍結乾燥標準血清は、0.5ml の蒸留水で溶解した場合に、標示された濃度になるように調製されている。

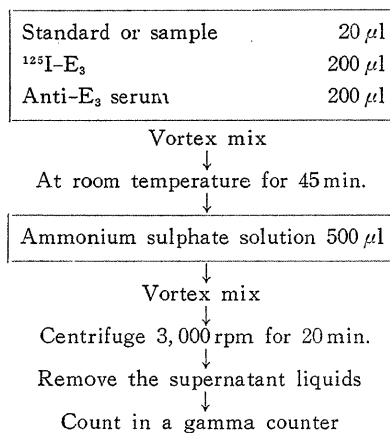
測定操作は図1に示すごとくで、標準血清あるいは被検血清 20 μl に <sup>125</sup>I-E<sub>3</sub>、抗 E<sub>3</sub> 血清をそれぞれ 200 μl 加え、室温で 45 分間 incubate した後、硫酸塩析法で B/F 分離を行い、沈渣の放射能を γ-counter で計測した。

測定はすべて duplicate でを行い、標準血清の cpm より標準曲線を描き、被検血清の E<sub>3</sub> 値を読み取った。

本 kit の種々の steroid に対する交叉反応は、Technical information (RCC 社)<sup>5)</sup> によれば表1のようになっている。

対象は、三重大学医学部附属病院および関連病院の産婦人科外来ならびに入院中の妊婦で、正常妊娠 120 例、双胎 4 例、妊娠中毒症軽症 11 例、妊娠中毒症重症 5 例、子宮内胎児死亡 3 例、子宮内胎児発育遅延 1

図1 Assay procedure



\* 三重大学医学部産婦人科学教室  
Nagayasu Toyoda: Measurements of unconjugated oestriol levels in pregnancy with Free E<sub>3</sub> RIA Pack.  
Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mie University.

例、無脳児1例である。

採血は肘静脈より行い、血清分離して測定時まで-20℃に保存した。

また、正常妊婦6例より出産した児の臍帯静脈血6検体についても検討した。

2. 測定結果

1) 標準曲線の再現性

10回の assay における各標準血清の B/T 値 (%) ならびにその平均、標準偏差、変動係数を示したものが表2である。Assay 番号1~4では、変動係数 C.V. は2.4~6.6%, assay 番号5~10では、1.7~3.0%となった。図2は、assay 番号5~10の平均値 ± S.D. を plot し、標準曲線を描いたものである。

表1<sup>5)</sup> Cross-reaction of steroids in the oestriol (unconjugated) RIA kit

Steroid	% Cross-reaction*
Oestrone	0.1
Oestradiol	1.3
Oestetrol	27.6
16-Epioestriol	7.7
17-Epioestriol	0.3
16, 17-Epioestriol	0.2
Oestriol-3-sulphate (Na)	2.4
Oestriol-3-glucuronide (Na)	2.3
Oestriol-16-glucuronide	0.1
16-Hydroxyoestrone	1.1
16-Keto-oestradiol	2.4
2-Methyloestrone	0.2
Oestrone sulphate (Na)	0.1
Progesterone	0.1
17-Hydroxyprogesterone	0.1
Dehydroepiandrosterone	0.1
Dexamethasone	0.1
Cholesterol	0
Cortisol	0

\* at steroid concentration of 100 ng/ml

表2 Reproducibility of standard curves of 10 assays (B/T %)

Value of standard	1	2	3	4	M	S.D.	C.V. (%)	Value of standard	5	6	7	8	9	10	M	S.D.	C.V. (%)
0	67.1	65.3	57.4	58.9	62.2	4.11	6.6	0	55.9	54.6	54.1	55.4	55.9	57.0	55.5	0.94	1.7
1.5	41.8	39.6	39.2	40.1	40.2	0.99	2.4	1.4	37.1	35.9	34.8	36.8	36.3	36.8	36.3	0.77	2.1
4.7	25.7	24.9	25.5	26.8	25.7	0.69	2.7	4.4	25.8	25.1	24.3	25.6	25.4	25.5	25.3	0.49	1.9
14.0	16.6	16.0	16.8	17.8	16.8	0.65	3.9	13.1	18.4	17.1	17.1	17.9	18.2	18.3	17.8	0.54	3.0
28.0	13.1	12.7	14.0	14.5	13.9	0.94	5.2	30.1	14.4	14.4	14.2	14.9	15.3	14.8	14.7	0.37	2.5

$$(S.D. = \sqrt{\frac{\sum x - \bar{x}}{n}}, C.V. = S.D./M)$$

2) 測定範囲ならびに最小検出感度

本 kit の測定範囲は 0~30 ng/ml とされている。標準曲線において B<sub>0</sub>/T の 95% に対応する E<sub>3</sub> 濃度を最小検出感度とすると、0.1 ng/ml となる。

3) 精度

Duplicate 測定値のばらつきより、各濃度階層別に intraassay variation を概算した(表3)<sup>6)</sup>。C.V. は 4.2~7.5% となった。

表4に interassay variation を示す。昭和53年9月29日に採血、血清分離し、-20℃で保存した control 血清の、約5カ月間にわたる8回の assay における値である。C.V. は 7.3% となった。また、約5カ月間にわたる測定において、明瞭な測定値の低下あるいは上昇傾向は認められなかった。

4) 測定範囲を超える血清の稀釈法

臍帯静脈血6検体につき、生理食塩水と E<sub>3</sub> free 血清による稀釈法を比較した(表5)。いずれも21倍に稀釈し、測定した。6検体とも生理食塩水稀釈のほうが

表3 Intraassay variation estimated by analysis of duplicate determination

Concentration range	Mean ± S	N	C.V. (%)
0.1~5	3.01 ± 0.13	38	4.2
5~10	7.63 ± 0.34	97	4.5
10~15	12.55 ± 0.55	83	4.4
15~20	17.13 ± 0.88	65	5.1
20~25	22.12 ± 1.10	39	5.0
25~30	27.35 ± 2.05	24	7.5
30~35	32.00 ± 1.58	12	4.9

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2N}}, C.V. = s/Mean$$

s = estimates of SD

d : difference between the two results in duplicate determinations

N : the number of duplicate determinations performed

低値となり、 $E_3$  free 血清稀釈の値に対し、平均 85.8% の値となった。以後、測定範囲を越える検体については、 $E_3$  free 血清により適当に稀釈し測定した。

5) 日内変動

5 例の入院中の妊娠後期婦人について、血中 unconjugated  $E_3$  の日内変動を検討した (図 3)。症例の内訳は、(1) 妊娠中毒症軽症、妊娠 37 週、(2) 前置胎盤の疑、妊娠 38 週、(3) 妊娠中毒症軽症、妊娠 38 週、(4) 横位、妊娠 34 週、(5) 子宮筋腫合併妊娠、妊娠 35 週である。変動係数は 6~12% で、夜間にやや高値となる印象を受けるが、明瞭な変動 pattern は認められない。

6) 正常妊娠各時期における血中 unconjugated  $E_3$  値

正常妊娠と考えられる妊娠 9 週より 41 週までの妊婦 120 例より得られた 210 検体につき、妊娠週数ごとに血中 unconjugated  $E_3$  値を plot したものが図 4 である。表 6 に、妊娠中期以降の各時期における平均値ならびに標準偏差を示す。

血中 unconjugated  $E_3$  値は、妊娠週数を経るにしたがい、しだいに高値となり、妊娠 40 週において頂

図 2 Reproducibility of standard curves of unconjugated  $E_3$

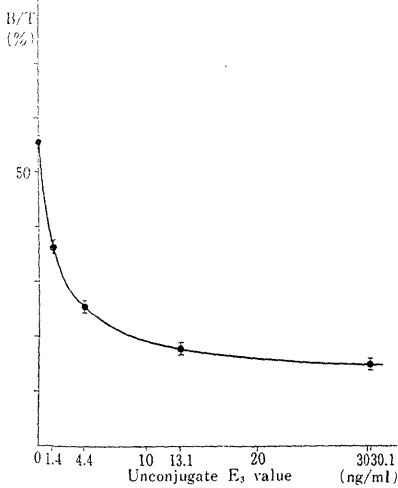


表 4 Interassay variation of unconjugated  $E_3$

No. of assays	1	2	3	4	5	6	7	8
Date of assays	(1978)10/4	10/11	11/8	12/13	(1979)1/31	2/6	2/10	2/14
$E_3$ level (ng/ml)	29.2	22.9	26.7	27.0	28.1	24.6	28.4	26.7

Mean=26.7, S.D.=1.94, C.V.=7.3%

値  $21.1 \pm 7.0$  ng/ml を示した。

7) 生物学的半減期

正常経膈分娩 7 例について、児娩出後 2 時間までの血中消失速度を検討した。児娩出後の時間に対する血中 unconjugated  $E_3$  値を、片対数座標に示したものが図 5 である。図に示すごとく、血中 unconjugated  $E_3$  は、児娩出直後の急峻な減衰と、その後の比較的緩徐な減衰の 2 相性減衰曲線を描く。第 1 期の半減期は 5~18 分、平均 11 分、第 2 相の半減期は 61~117 分、平均 94 分となった。

8) 異常妊娠例の検討

妊娠中毒症軽症 11 例について、unconjugated  $E_3$  値の推移を示したものが図 6 である。ほぼ正常域に入り、特に一定の傾向は認めない。

妊娠中毒症重症 5 例については、図 7 に示すように

図 3 Diurnal variations of serum unconjugated  $E_3$

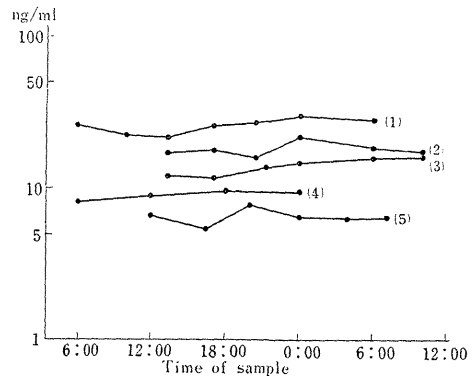


表 5 Unconjugated  $E_3$  levels in cord serums

	Diluted by saline	Diluted by $E_3$ -free serum
1	517	557
2	319	342
3	336	428
4	153	170
5	265	317
6	242	317

ほぼ正常域に入ったが、妊娠 35 週で子宮内胎児死亡を来した症例(1)では、児心音消失確認時の検体で、著明な低下を示した。本症例はその約3時間後に 2,220 g の死児と 430 g の胎児附属物を娩出した。他の4例の詳細を以下に示す。症例(2)は妊娠 35 週にて早産、児体重 2,120 g, Apgar 9点, 胎児附属物重量 365 g。症例(3)妊娠 36 週にて分娩誘発、児体重 2,270 g, Apgar 8点, 胎児附属物重量 540 g。

図 4 Serum unconjugated E<sub>3</sub> levels in uncomplicated pregnancies

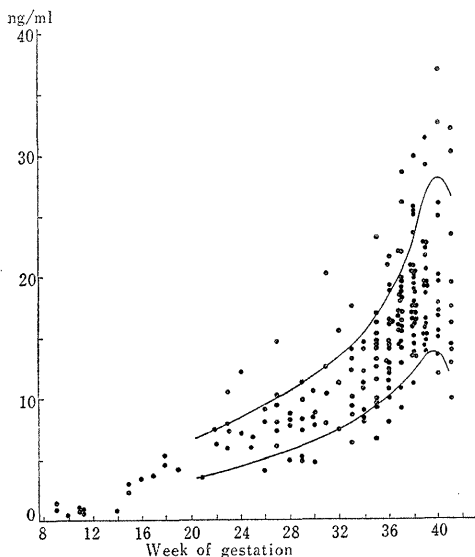


表 6 Means and standard deviations of serum unconjugated E<sub>3</sub> levels in uncomplicated pregnancies

Weeks of gestation	Number of cases	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)
16~19	5	4.26	0.62
20~23	7	6.91	1.94
24~27	14	8.11	2.79
28~29	10	7.6	2.0
30~31	11	9.6	3.9
32~33	12	11.6	3.3
34~35	23	12.3	3.5
36	19	14.5	3.6
37	24	17.0	4.1
38	27	18.3	4.4
39	19	18.7	4.1
40	16	21.1	7.0
41	11	19.2	6.8

症例(4)妊娠 38 週にて帝王切開術を施行、児体重 2,420 g, Apgar 1分後 6点, 5分後 9点, 胎児附属物重量 450 g, 症例(5)妊娠 39 週にて分娩誘発、児体重 3,000 g, Apgar 10点, 胎児附属物重量 500 g。

妊娠中毒症以外の原因によると考えられる2例の子宮内胎児死亡例でも低値を示した。また無脳児では極端な低値を示した。

一方、子宮内胎児発育遅延(妊娠 41 週にて分娩誘発、児体重 1,580 g, 胎児附属物重量 340 g)で、出生後 18-trisomy と判明した1例でも低値を示した。

さらに、双胎妊娠例では、3例のうち2例が高値を

図 5 Serum unconjugated E<sub>3</sub> level after delivery

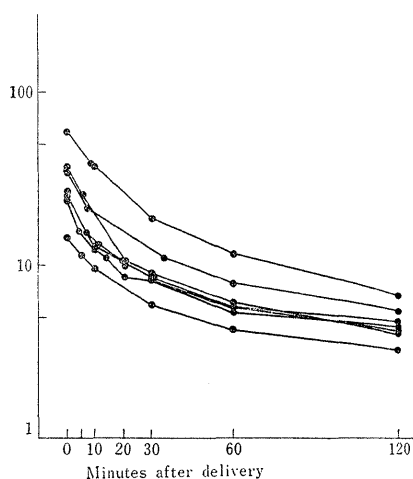
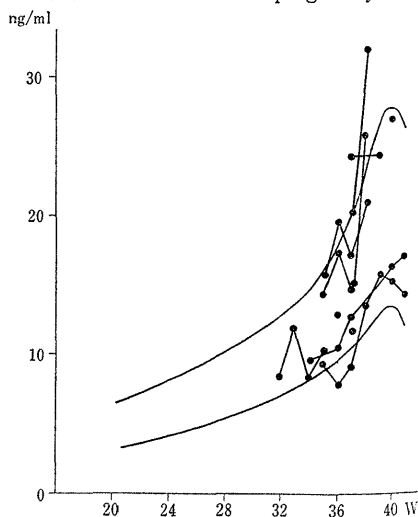


図 6 Serum unconjugated E<sub>3</sub> levels in patients with mild toxemia of pregnancy



示した。

### 3. 考 察

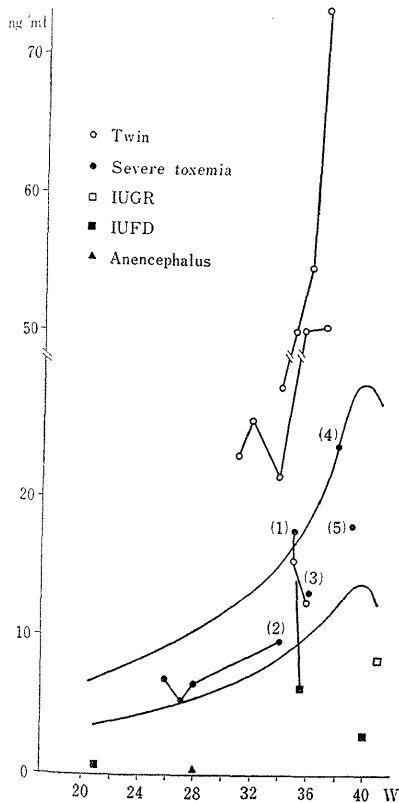
#### 1) kit の特異性について

今回、使用した血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定用 RIA kit, (フリー E<sub>3</sub> リアパック) に用いられている抗 E<sub>3</sub> 血清は、従来報告されているものに比し、特異性が高く、主な交叉反応は oestetrol と 27.6%, 16-epiestriol と 7.7% であるが、いずれも血中濃度は oestriol に比し極めて小さく、測定上問題になることはないと考えられる。また ether extraction 操作を加えた場合と比較した結果 (図 8)<sup>9)</sup> によると、両者はよく一致し、本 kit による direct assay は、unconjugated E<sub>3</sub> に specific であり、extraction step は省略してさしつかえないとされている。

#### 2) 測定操作の簡易性について

本 kit は、上述のように抽出操作が省略されたため、測定に要する時間も短縮され、1 キット 20 検体を duplicate で測定するのに要する時間は 2~3 時間である。

図 7 Serum unconjugated E<sub>3</sub> levels in complicated pregnancies



また、標識核種に <sup>125</sup>I が用いられたため、医療施設に広く普及している well type  $\gamma$ -counter が使用可能である。

被検血清量は、1 determination につき 20  $\mu$ l と少量で、測定域は 0~30 ng/ml とされ、妊娠後期の血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定に適するように設定されている。

図 8<sup>9)</sup> Effect of ether extraction on assay values

The relationship between the values obtained was: value after extraction = (1.02  $\times$  direct assay value) - 0.95. The correlation coefficient was 0.92 (100 samples)

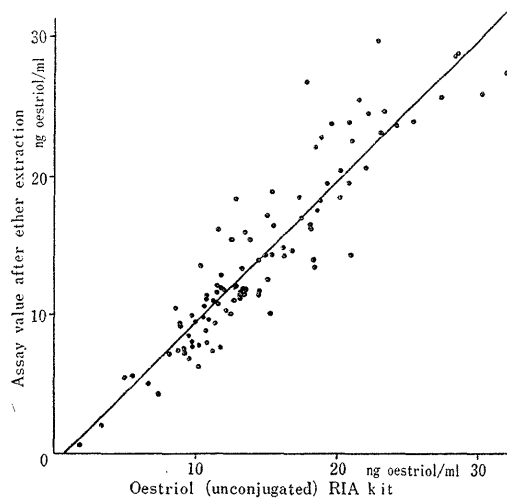
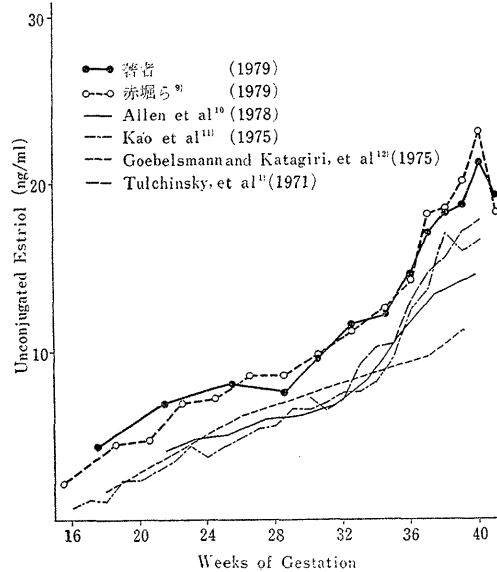


図 9 Published levels for serum unconjugated



なお、さらに短時間の測定が必要な場合には、incubation time を 15 分間に短縮する emergency assay<sup>5)</sup> も可能とされている。

### 3) 精度

今回の私どもの検討では、intraassay variation 4.2 ~ 7.5%, interassay variation 7.3% となり、ほぼ満足すべき精度を有していると考えられる。

### 4) 日内変動

血中 unconjugated E<sub>3</sub> の日内変動については、夜間に軽度の高値傾向を示すという報告<sup>7,8)</sup> があるが、その変動幅はいずれも小さい。私どもの成績でも C.V. は平均は 10% であり、やや夜間に高値傾向を示すも、明瞭な変動ではなく、胎児胎盤機能としての血中 unconjugated E<sub>3</sub> の評価に、日内変動の影響は考慮しなくてもさしつかえないと考えられる。

### 5) 妊娠経過における推移

私どもの成績と諸家の成績との比較を図 9 に示す。いずれも RIA による血中 unconjugated E<sub>3</sub> の測定値である。本 kit による値は、従来の報告に比し、やや高値傾向を示すようである。本 kit と同一の kit を使用した赤堀らの成績<sup>9)</sup> とは、極めてよく一致している。

### 6) 生物学的半減期

血中 unconjugated E<sub>3</sub> の生物学的半減期は、私どもの成績では平均 11 分と極めて短く、胎児胎盤系による E<sub>3</sub> 産生能を鋭敏に反映すると考えられる。

### 7) 異常妊娠例

妊娠中毒症軽症例では、特に一定の傾向を示さず、諸家の報告<sup>10,13)</sup> と一致している。

妊娠中毒症重症例では、低値傾向を示すという報告<sup>10,13)</sup> が多いが、今回検討した 5 例は、いずれも正常域に入った。

子宮内胎児死亡、無脳児、子宮内胎児発育遅延では、諸家の報告と同様、低値を示した。

### 8) 胎児胎盤機能検査としての血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定の意義

現在、臨床的には尿中 E<sub>3</sub> 測定が胎児胎盤機能検査として広く用いられているが、いくつかの欠点が指摘されている<sup>13)</sup>。例えば、(1) 24 時間蓄尿の煩雑さおよび不正確さ、(2) 24 時間後にはじめて胎児胎盤機能の評価できる。(3) 腎機能の影響を受けやすい、(4) 個体間のばらつきが大きい、などである。血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定は、これらの点について、尿中 E<sub>3</sub> 測定よりも優れた胎児胎盤検査法と考えられる。しかし、個体間のばらつきについては、尿中 E<sub>3</sub> より小さいとされているものの<sup>6)</sup>、なお無視できない面も

あり、やはり連続的な測定による変動 pattern から分析する必要があるのではないかと考えられる。

## ま と め

Direct RIA による血中 unconjugated E<sub>3</sub> 測定用 kit (フリー E<sub>3</sub> リアパック) により、正常妊婦ならびに異常妊婦における E<sub>3</sub> 値を検討し、次の結果を得た。

(1) フリー E<sub>3</sub> リアパックは、特異性ならびに精度ともに優れた kit である。

(2) フリー E<sub>3</sub> リアパックの測定操作は簡易で、少量の検体で短時間に測定が可能である。

(3) 日内変動は小さく、測定上問題とならない。

(4) 正常妊婦では妊娠経過に従い、しだいに高値となり、妊娠 40 週に頂値となる。

(5) 生物学的半減期は極めて短く、胎児胎盤系における E<sub>3</sub> 産生能を鋭敏に反映する。

(6) 妊娠中毒症などによる子宮内胎児死亡、子宮内胎児発育遅延、無脳児では低値を示す。

稿を終るにのぞみ、検体を提供していただいた、国立津病院、佐原十四男医長ならびに宮村吉麿先生、検体採取に協力していただいた産科病棟の助産婦、看護婦諸氏、ならびに教室員諸氏に感謝いたします。また、kit を提供された科研化学株式会社に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Tulchinsky, D., et al.: J. Clin. Endocr., 33: 775, 1971.
- 2) Gurbide, E., et al.: Am. J. Obstet. Gynec., 109: 897, 1971.
- 3) Den, K., et al.: Endocrinol. Japon., 20: 315, 1973.
- 4) Katagiri, H., et al.: Steroids, 24: 225, 1974.
- 5) The Radiochemical Centre Amersham England. Oestriol (unconjugated) RIA kit for the immunoassay of unconjugated (free) oestriol in pregnancy serum.
- 6) Abraham, G.E.R., et al.: J. Clin. Endocr., 32: 619, 1971.
- 7) Katagiri, H., et al.: Am. J. Obstet. Gynecol., 124: 272, 1976.
- 8) Hull, M.G.R., et al.: Br. J. Obstet. Gynec., 85: 645, 1978.
- 9) 赤堀周一郎, 他: 産婦の世界, 31: 115, 1979.
- 10) Allen, E.I., et al.: Br. J. Obstet. Gynec., 85: 278, 1978.
- 11) Kao, M., et al.: J. Lab. Clin. Med., 86: 513,



- 1975.
- 12) Goebelsmann, U., et al.: J. Steroid Biochem., 6: 703, 1975.
- 13) Bashore, R.A., et al.: Am. J. Obstet. Gynec., 128: 371, 1977.
-