

Application News

ステロイドホルモン20種の一斉分析 およびエストロゲンの高感度分析

新苗 智也、荒尾 洋平、馬越 泰

ユーザーベネフィット

- ◆ ステロイドホルモン20種の一斉分析を測定時間15分で実施できます。
- ◆ 誘導体化によるエストロゲンの高感度分析が可能です。

■はじめに

ステロイドホルモンは、分子構造内にステロイド骨格を持ち、代謝・神経伝達・遺伝子発現・生殖・血圧・血管透過性など幅広い生理現象の制御メカニズムに関わる事の特徴とする生体分子群です。近年、ステロイドホルモンを一斉分析しプロファイルとして解析するアプローチが、再生医療や発癌研究において新しい知見をもたらしており、注目を集めています。ステロイドホルモンのプロファイルを簡便に測定できるようにすることが、様々な疾患のメカニズム解明や治療法に繋がる研究を加速するものと期待されています。

ステロイドホルモンの測定法として、ELISA や RIA などの免疫アッセイ技術が広く普及していますが、測定項目の数だけ試薬キットとサンプル量が必要なため、プロファイルの解析には不向きです。さらに、免疫アッセイでは抗体の交差反応により結果が不正確になるリスクがあることから、特異性の高いLC/MS/MSによるステロイドホルモン定量メソッドが研究用途で開発されてきました。一方、生体試料中のステロイドホルモンは、エストロゲン等きわめて低濃度なものが高濃度なものと共存しているため、定量ダイナミックレンジに優れたLC/MS/MS法であっても、一斉分析を確立するためには様々な工夫が求められます。

本報では、「LC/MS/MSメソッドパッケージステロイドホルモン」（以下、本メソッドパッケージ）を用いて血清添加試料からステロイドホルモン20種を一斉定量した事例を紹介いたします。本メソッドパッケージには、前処理方法および20種のステロイドホルモンの定量が可能な分析条件が収載されています（図1、2）。



図1 LC/MS/MSメソッドパッケージステロイドホルモン

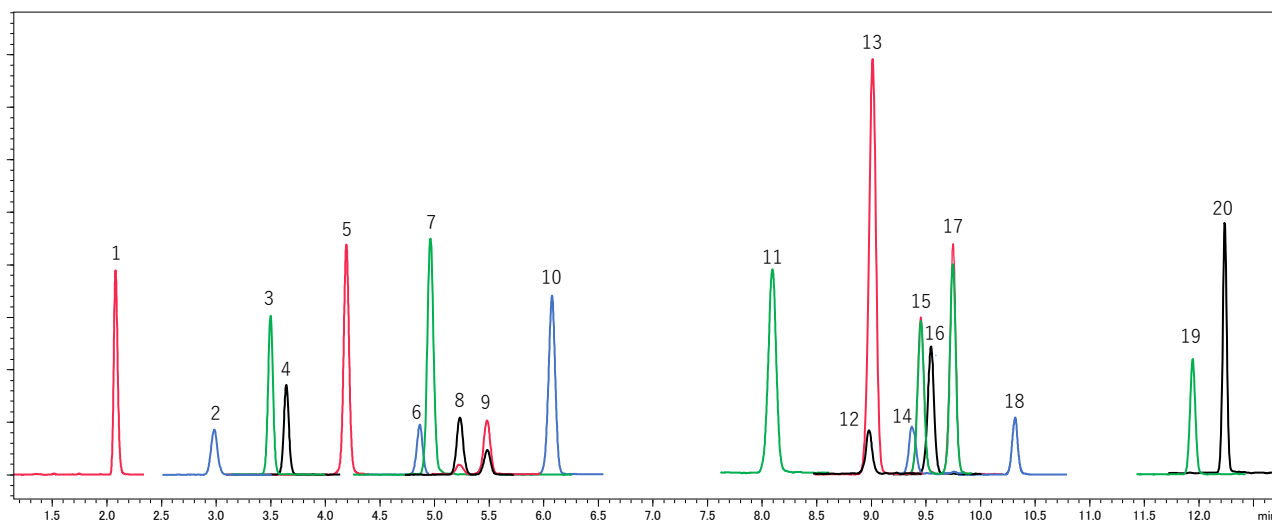


図2 メソッドパッケージを用いて一斉分析したステロイドホルモン20種のマスクロマトグラム

1. Estrinol (Derivatized), 2. Aldosterone, 3. Cortisol, 4. Cortisone, 5. Estradiol (Derivatized), 6. Dehydrocorticosterone, 7. Estrone (Derivatized), 8. 21-Deoxycortisol, 9. Corticosterone, 10. 11-Deoxycortisol, 11. Androstenediol, 12. 17-Hydroxypregnenolone, 13. Testosterone, 14. Dehydroepiandrosterone, 15. Deoxycorticosterone, 16. Androstenedione, 17. 17-Hydroxyprogesterone, 18. Dihydrotestosterone, 19. Pregnenolone, 20. Progesterone

■ 前処理および分析条件

ステロイド除去済みのブランク血清（Golden West Diagnostics社製，Catalog#: MSG3000, Mass Spect Gold Human Serum, Ultra-Low Hormones & Steroids, Lipid Free）に、ステロイドホルモン20種、および内部標準物質として安定同位体19種を添加し、標準試料添加血清を調製しました。また、0.5、1、5、10、50、100、500 pg/mLおよび1、5、10 ng/mLのステロイドホルモン標品混合試料を検量点サンプルとして調製しました。各試料を前処理した後、LC/MS/MSによる定量分析を行い、正確さおよび精度(CV)を算出しました。

検量線試料および標準試料添加血清に対する前処理（特許出願中：2023-015154）

前処理フローを以下に示します（図3）。検量線試料または標準試料添加血清を固相カラムに通して、エストロゲンとエストロゲン以外に分離しました。その後、エストロゲン画分に誘導体化試薬（2-Fluoro-1-methylpyridinium *p*-Toluenesulfonate）を用いて誘導体化反応を行いました（図4）。誘導体化反応後に、両画分を混合し、LC/MS/MSに導入しました。

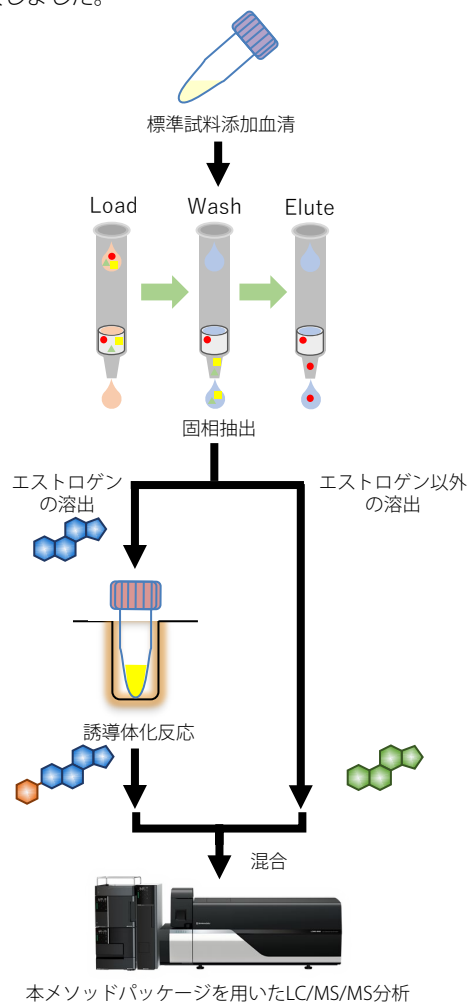


図3 前処理フロー図

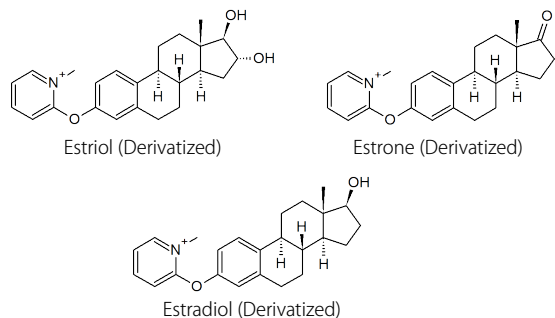


図4 誘導体化エストロゲン

LC/MS/MS分析条件

LC/MS/MSによる分析条件を表1に示します。

表1 LC/MS/MS分析条件

System	: Nexera™ X3
Column	: HALO ES-C18, 100 mm x 3.0 mm I.D., 2.7 μm
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution (15 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 10 μL
System	: LCMS-8060
Ionization	: ESI (Positive)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
Interface temp	: 400 °C
DL temp	: 300 °C
Heat block temp	: 500 °C
Interface Voltage	: 0.5 kV

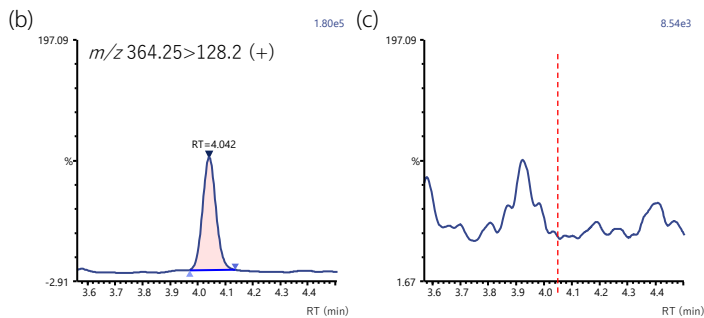
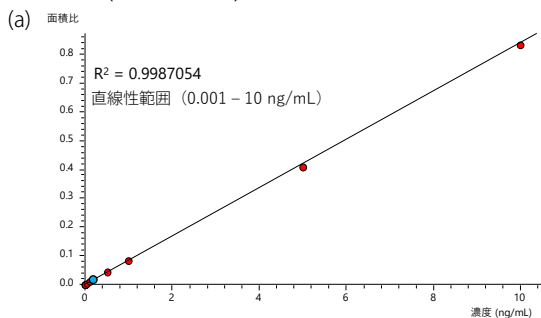
■ 本メソッドパッケージを用いた定量分析

表2に標準試料添加血清中のステロイドホルモン濃度を定量した結果（n=3）を示します。本メソッドパッケージを用いることで、良好な定量結果が再現良く得られました（70% < 正確さ < 130%、CV < 20%）。図5に誘導体化エストロゲンの検量線および標準試料添加血清のマスキンググラムを示します。誘導体化エストロゲンの各LOQは、Estradiolは1 pg/mL、Estroneは0.5 pg/mLおよびEstriolは100 pg/mLでした。

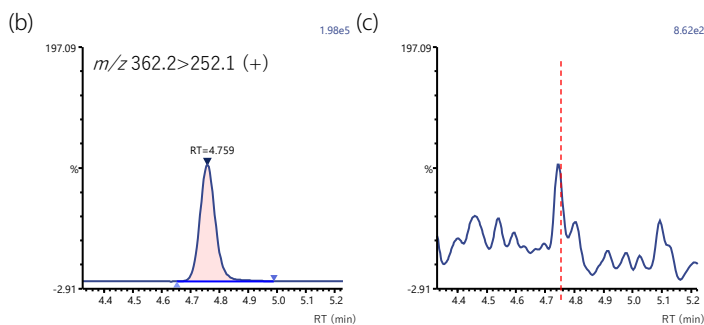
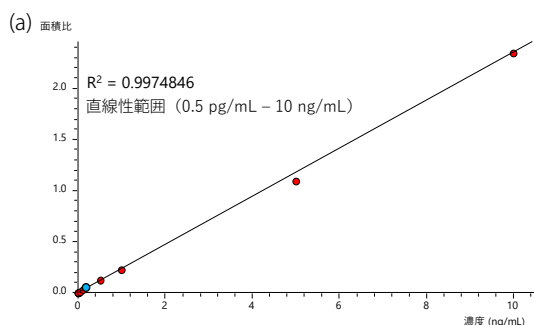
表2 標準試料添加血清から定量（n=3）したステロイドホルモン20種

#	Compounds	添加濃度 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	正確さ%	CV
1	Aldosterone	750	830	110	9.1
2	Cortisol	750	775	103	2.2
3	Cortisone	750	789	105	2.7
4	Dehydrocorticosterone	750	804	107	6.0
5	21-Deoxycortisol	750	700	93	3.7
6	Corticosterone	200	258	129	17.4
7	11-Deoxycortisol	200	231	116	12.6
8	Androstenediol	2000	1436	72	5.2
9	Testosterone	750	811	108	1.9
10	17-Hydroxypregnenolone	2000	2260	113	9.4
11	Dehydroepiandrosterone	750	720	96	6.7
12	Androstenedione	750	810	108	2.1
13	Deoxycorticosterone	200	203	102	17.9
14	17-Hydroxyprogesterone	750	790	105	5.7
15	Dihydrotestosterone	750	824	110	3.1
16	Pregnenolone	750	942	126	4.3
17	Progesterone	750	818	109	2.4
18	Estradiol (Derivatized)	200	195	98	0.6
19	Estrone (Derivatized)	200	235	117	1.2
20	Estriol (Derivatized)	200	195	98	16.8

Estradiol (Derivatized)



Estrone (Derivatized)



Estriol (Derivatized)

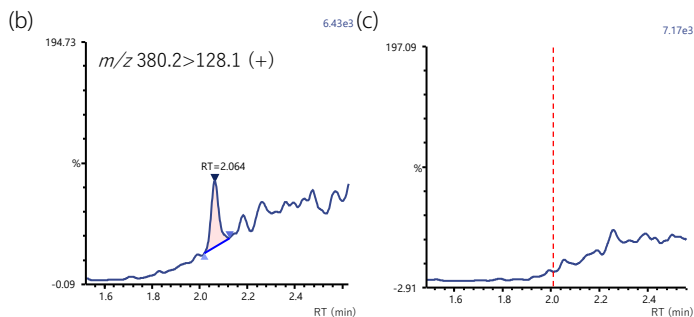
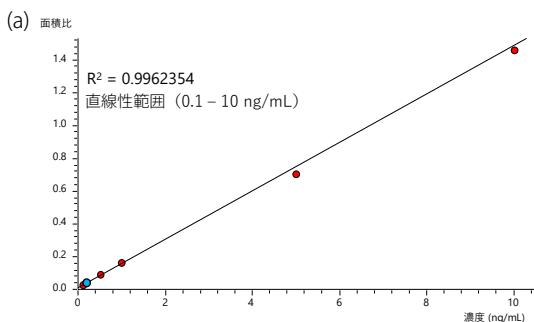


図5 誘導体化エストロゲンの検量線とマスクロマトグラム
 (a) 検量線、(b) 標準試料添加血清 (エストロゲン添加濃度200 pg/mL) のマスクロマトグラム、(c) ブランク血清のマスクロマトグラム

■ まとめ

ヒトブランク血清に添加した20種のステロイドホルモンを対象に、LC/MS/MSメソッドパッケージステロイドホルモンを用いた定量分析を行いました。本メソッドパッケージによる分析では測定時間15分でステロイドホルモン20種を定量し、全ての成分について良好な定量結果が得られました。誘導体化エストロゲンについては、Estradiolは1 pg/mL、Estroneは0.5 pg/mLおよびEstriolは100 pg/mLのLOQを示し、高感度分析を達成しました。「LC/MS/MSメソッドパッケージステロイドホルモン」を用いることにより、血清中ステロイドホルモンの一斉定量が可能です。

■ 謝辞

本アプリケーションの作成にあたり、国立環境研究所中山祥嗣先生には、試料のご提供や分析条件のご教示など多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00524-JP 初版発行：2023年 4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
 本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
 本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
 本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。