



COSMO BIO CO., LTD.

Inspiration for Life Science

Anti Pregnanediol-3-glucuronide polyclonal antibody

Product No. FKA-334E

The Cross reactivities of anti Pregnanediol-3-glucuronide-BSA (FKA-334E) by ELISA with Pregnanediol-3-glucuronide-HRP (FKA-333)

Antigen	Pregnanediol-3-glucuronide-BSA	
Antibody(FKA-334E)	Purified by Protein A and lyophilized antibody	1 μ l / Vial
Dilution of IgG	2000test for ELISA	50 μ l/well use
Label (FKA-333)	Pregnanediol-3-glucuronide-HRP	1ml / Vial
	1,000test for ELISA	50 μ l/well use
O.D.(492/600nm) of B0	about 1.5	
Pregnanediol-3-glucuronide dose of B0/2	50 ng / ml	
Strage/Handling	Maintain at 4°C-8 °C (-20 °C for long term storage)	
	In undiluted aliquots. Avoid repeated freeze/thaw cycles.	

Steroid	Cross Reaction
Pregnanediol-3-glucuronide	100 %
Pregnanediol	100 %
20 alpha-OH-Progesterone	16.00 %
Progesterone	2.30 %
5 Beta-Pregnane-3 Alpha, 20 Beta-diol	0.80 %
5 Beta-Pregnane-3 Beta, 20 Alpha-diol	0.20 %
5 Beta-Pregnane-3 Beta-ol-20-one	0.10 %
Pregnenolone	0.05 %
17 Alpha-OH-Progesterone	0.02 %
17 Alpha-OH-Pregnenolone	0.01 %
Cortisol	0.01 %
The other Steroids	0.00 %

For research use only; not for use as a diagnostic.



COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

TOYO EKIMAE BLDG, 2-20, TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN

TEL: +81-3-5632-9617 FAX: +81-3-5632-9618 e-mail: export@cosmobio.co.jp

www.cosmobio.co.jp

The ELISA of Pregnanediol-3-glucuronide according to FKA 334-E and FKA 333

The Cross reactivities of anti Pregnanediol-3-glucuronide-BSA IgG(FKA 334-E) by ELISA with Pregnanediol-3-glucuronide-HRP(FKA 333)

antigen	5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol-3-glucuronide-BSA
	FKA 334-E rabbit No.63. 1 μ l / Vial
Dilution of IgG	x200,000 for ELISA 50 μ l/well use
L a b e l (FKA 333)	Pregnanediol-3-glucuronideHRP
	x5,000 50 μ l/well use
O. D. (492/600nm) of B ₀	about 1.5
Pregnanediol-3-glucuronide of B ₀ /2	50 ng/ml (250pg/well)

S t e r o i d	C r o s s R e a c t i o n
Pregnanediol-3-glucuronide	100 %
Pregnanediol	100 %
20 α -OH-Progesterone	16.0 %
Progesterone	2.3 %
5 β -Pregnane-3 α ,20 β -diol	0.8 %
5 β -Pregnane-3 β ,20 α -diol	0.20 %
5 β -Pregnane-3 β -ol-20-one	0.1 %
Pregnenolone	0.05 %
17 α -OH-Progesterone	0,02 %
17 α -OH-Pregnenolone	0.01%
Cortisol	0.01 %
The other Steroids	0 %

an abbreviation.:P-diol=Pregnanediol=5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol HRP=Horse radish peroxidase

FKA #334E

再溶解の方法

元の抗血清 2ul 分の IgG がバイアルに入っています。Assay Buffer (BSA 含有) 10ml で溶解してください。溶解したものは 5,000 倍希釈液です。使用時、100,000 倍まで希釈してご使用下さい。

(使用方法に関しては参考文献を参照)

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20
TEL 03-5632-9610 FAX 03-5632-9619
<http://www.cosmobio.co.jp>

V. 内分泌学的検査 E. 性腺・胎盤関係

プレグナンジオール(P₂)*神戸川明¹表1 尿中プレグナンジオール正常値¹⁾

	平均±SD	範囲
成人男子	0.6±0.4 mg/日	0.1~1 mg/日
卵胞期	0.9±0.4 mg/日	0.1~1.5 mg/日
黄体期	3.6±1.5 mg/日	1.5~8.5 mg/日
妊娠 6~16週		4~10 mg/日
17~24週		5~40 mg/日
25~40週		20~100 mg/日

はじめに

5β-プレグナン-3α,20α-ジオールのことを通称名としてプレグナンジオールという。プレグナンジオールは、黄体で作られたプロゲステロンが肝臓の3つの還元酵素、すなわち5βリダクターゼと3と20のケトンのα-ヒドロキシデヒドロゲナーゼによって作られる。これら還元酵素には5αリダクターゼも存在するし、3βと20βのヒドロキシデヒドロゲナーゼも存在するが、圧倒的に5β, 3α, 20αの還元酵素が多いので、プロゲステロンの主代謝物は5β-プレグナン-3α,20α-ジオールであり、これがさらに3位にグルクロン酸が抱合して5β-プレグナン-3α,20α-ジオール-3-グルクロニドとして尿に排泄される(図1)。

このプロゲステロンと中間の代謝物の一部は胆汁で排泄されるが、腸から再吸収されてほとんどが尿に排泄されるので、体内で作られたプロゲステロン量は尿中のプレグナンジオールグルクロニドを測ることで推定できる。なお副腎皮質と睾丸でコルチゾールやテストステロンを合成する重要な中間物質であるプロゲステロンは、一部が血中に分泌されてくるので、男子で

も小児でも尿中にプレグナンジオールグルクロニドが存在する。従来から尿中のプレグナンジオールの測定は、加水分解してグルクロニドを切り離してから溶媒で抽出して、比色¹⁾とかガスクロマト^{2,3)}で測定してきた。

尿中のプレグナンジオールグルクロニドはRIA⁴⁾やEIA⁵⁾でこの抱合体を直接測定できるようになってきたが、データとして出す場合は抱合体でない遊離のプレグナンジオールとしての量で示す。

1. 検査の目的

プレグナンジオールを測る目的の大部分は、排卵後の黄体期に黄体からプロゲステロンが十分に分泌しているか否かをみることに、着床した受精卵が流産しないようにプロゲステロンが妊娠黄体から分泌して子宮内膜の増殖と分泌を促して妊娠維持をするのに必要な量が出ているかをみることである。

血中プロゲステロンを来院時に1回測定して、黄体機能が正常か不全かをみることはできない。黄体機能不全症には2つのタイプ、①プレグナンジオールが正常の黄体期の値より低値を示すもの、②プレグナンジオールが正常の値になるが、その期間が短いものがある。この原因は卵胞発育が不十分のため排卵後の黄体細胞が少ないことや、LH surgeが不十分のため無排卵であったり、また黄体細胞の退行が早かったりすることによる。

なおプロゲステロンは体温上昇作用があり、起床時の体温すなわち基礎体温(BBT)は、正常では月経後の卵胞期は36.7°C以下の低温を、排卵後は尿中プレグナンジオールの値と同調して高温になり、月経がくるにつれて低下する(図2)。この基礎体温は黄体機能を反映するこ

Key words: 黄体形成ホルモン(luteinizing hormone; LH), 黄体機能, BBT, pregnanediol(P₂), pregnanediol-3-glucuronide, 黄体ホルモン, 性周期 *Pregnanediol(P₂)¹⁾ Akira KAMBEGAWA: 帝国臓器製薬(株)研究本部 Research Division, Teikoku Hormones Mfg. Co. Ltd.

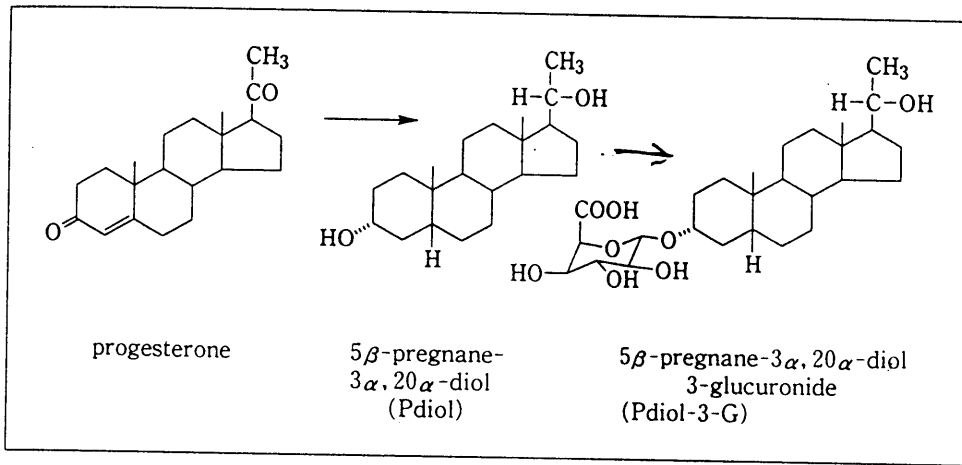


図1 プロゲステロンの代謝経路

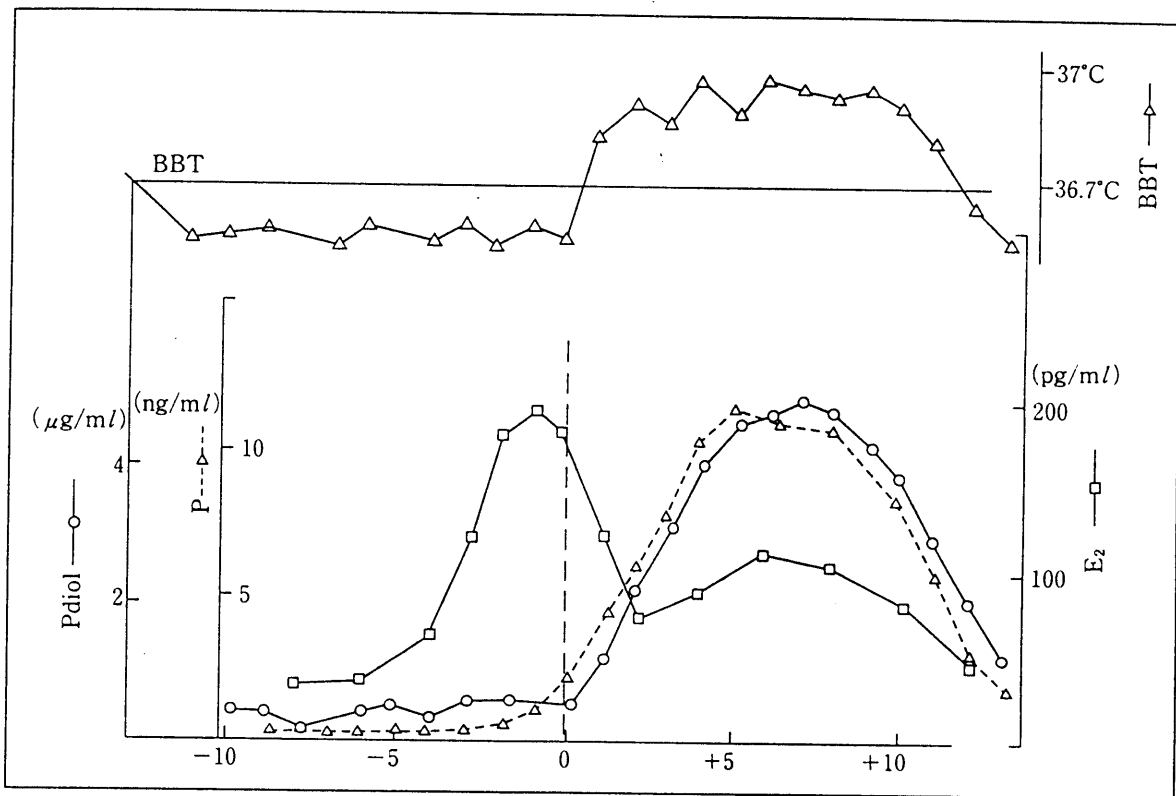


図2 正常性周期の BBT, 血中 progesterone (P) と estradiol (E₂) と尿中 pregnanediol (Pdiol) の変化¹⁾

LH surge を 0 日とする。尿は早朝尿, 採血は AM 9:00.

とから, 血中プロゲステロンや尿中プレグナジールの測定に先行して測られる。尿中プレグナジールの利点は, 採血でなく在宅で蓄尿ができ, 逐日的に黄体機能を測ることができるところである⁶⁾。

2. 測定法

a. キャピラリーガスクロマト法³⁾

24時間尿の 5 ml を pH 5 にし, β glucuronidase arylsulfatase 20,000 Fishman 単位加え, 37°C 24 時間水解後, 酢酸エチル 20 ml で抽出, 0.1 N NaOH で洗い, 水で中性になるまで洗

う。Na₂SO₄ 脱水後真空乾燥する。これに trimethylsilylimidazol と bis(trimethylsilyl) acetamide と trimethylchlorosilane(3:3:2) 混液 100 μl を加え、60°C 20 時間反応後 N₂ で乾固し、ジクロロメタン 2 ml に溶かし、0.1 N 硫酸と水で洗い、乾固後ヘキサン 50 μl に溶かし、ガラスキャピラリーカラム OV 101 コーティング 20 m に入れ、注入部 300°C、カラム温度 180~260°C、0.4°C/分で昇温し、FID で、クロマトグラムのプレグナンジオールの面積と内標コレスタンとの比から定量する。

b. Direct RIA 法⁴⁾

蒸留水で 500~2,000 倍に希釈した尿 50 μl、およびプレグナンジオール-3-グルクロニド (Pdiol-3-G) 0~5 ng を水 50 μl に溶かした標準液を、2 本ずつ試験管にとる。これらに抗 Pdiol-3-G-BSA 血清 10,000 倍希釈の 0.05% BSA 含有 0.05 M ホウ酸緩衝液 100 μl を加え 15 分インキュベートする。これに、Pdiol-1, 2-³H(20 α-OHP-1, 2-³H を、ラット肝上澄と NADPH で作る) 10,000 dpm のホウ酸緩衝液 100 μl を加え、さらに 30 分インキュベートする。これに飽和硫酸アンモニウム液 250 μl を加え、10 分後 3,000 rpm で 10 分間遠沈し、その上澄 250 μl の ³H をカウントし、標準曲線から尿 1 ml 中の Pdiol-3-G を求め、遊離 Pdiol 値 (μg/ml) を算出する。

c. Direct ELISA 法⁵⁾

第二抗体 (抗ウサギ IgG ヤギ IgG) 固相化マイクロプレートに標準液 Pdiol-3-G を 0~2,000 pg/50 μl、尿は 1,000 倍希釈液 50 μl を 2 穴ずつ入れる。これに抗 Pdiol-3-G-BSA 血清 60,000 倍希釈液 50 μl と Pdiol-3-CMO-β-galactosidase (モル比 8:1) 1 μg/ml 液 50 μl を加えて 2 時間室温でインキュベートする。3 回生理食塩水で洗い、0.06% o-nitrophenyl-β-D-galactoside 含有の緩衝液 100 μl を加え、37°C 90 分インキュベートし、1 M Na₂CO₃ 50 μl を加えて反応を止め、プレートリーダー波長 415 nm で測り、標準曲線から尿 1 ml 当たりの Pdiol-3-G を出し、遊離のプレグナンジオール値に換算する。

3. 正常値

1 日蓄尿してプレグナンジオールの mg/日 で表すが、随時尿でクレアチニン 1 g がほぼ 1 日量であることから Pdiol mg/creatinine g で表すこともある⁶⁾。外国のプレグナンジオール値は早朝尿で μmol/l⁷⁾ とか蓄尿での μmol/日⁸⁾ で表すのが多い。このモル濃度は Pdiol-3-G でも水解して Pdiol でも同じ値である。我が国では遊離の Pdiol の量で今まで示してきているので、direct の RIA や EIA で測った Pdiol-3-G の値を分子量で計算して Pdiol の値にしている^{4,5)}。

4. 尿中プレグナンジオール値に影響ある因子

図 2 に示すように卵胞が成熟するに従ってエストラジオールが増加すると、これが引き金になって LH surge が起こる。LH surge によって排卵が誘導され、排卵後の顆粒膜細胞と夾膜細胞が黄体化する。すなわちプロゲステロンとエストラジオールを出す。受精卵が着床すると胚から hCG を出すことで黄体が賦活化され妊娠黄体になりプロゲステロンを出し続けるが、胚がないときは黄体が退化してプロゲステロンの分泌がなくなる。これによって月経が起こるわけである。

卵胞期に黄体ホルモン gestagen を投与すると、下垂体の LH の分泌を抑制して LH surge が起こらない。結果として避妊として働く。また黄体期に gestagen を投与すると、投与している間は月経がこない。この gestagen 剤はプロゲステロンよりも強い合成のものであり、下垂体を抑制して尿中プレグナンジオールが減少する。また黄体期に hCG を負荷すると尿中プレグナンジオールが増加する。故に採尿の前 3~4 日は gestagen 剤や hCG の投与は中止すべきである。

5. 採尿時期と保存

採尿が排卵後の何日目か、妊娠何週目か不明では、測定結果が正常であるか否かがわからない

現在は β-gal
2.12 x 2 HRP
ポロイ
5:1
HRP
現在は HRP
使用

2週間の黄体期を毎日蓄尿することはできないので、2日おきに随時尿をとって測ると、黄体からプロゲステロンを出している期間も知ることができる。しかし一般的にはBBT上昇後第8, 9日の2日間蓄尿して測る方法が用いられている。蓄尿後、尿量を測り、約20 mlを測定まで4°Cで保存する。

おわりに

黄体機能検査はこのプレグナンジオールのほかにBBT, 頸管粘液検査と血中尿中エストロゲンと血中プロゲステロンの検査がある。

尿のプレグナンジオール-3-グルクロニドの特異性の高い抗体ができたことから古典的な比色法¹⁾は用いられなくなり、尿を抽出することなくEIAで短時間に測定できるようになってきた⁵⁾。なおE₁-3-G/Pdiol-3-Gの比で卵巣機能を評価したり⁹⁾、迅速EIA法で子宮外妊娠の診断をした報告¹⁰⁾が外国にみられ、1日蓄尿より随時尿や早朝尿^{7,11)}での評価が多く、我が国でも患者に負担がかかる1日蓄尿は少なくなると思う。

文 献

1) 神戸川明: 尿中Pregnanediolの新測定法. ホルモンと臨床 8: 964-970, 1960.
2) 石神達三, 佐藤誠也: プレグナンジオールとプレグ

ナントリオール. Medical Technology 6: 1191-1198, 1978.
3) Adatia R, Cooke M: An improved method for steroid profile analysis using capillary gas chromatography. Chromatographia 25: 598-602, 1988.
4) 吉村幸子ほか: [1,2,6,7-³H]Pregnanediolを用いた尿中Pregnanediolの直接Radioimmunoassay法. 日不妊会誌 32: 571-576, 1987.
5) Mitsuma M, et al: Development of a direct microplate enzyme immunoassay for the determination of pregnanediol-3 α -glucuronide in urine. J Steroid Biochem 32: 467-471, 1989.
6) Munro CJ, et al: Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. Clin Chem 37: 838-844, 1991.
7) Chatterton RT, et al: Radioimmunoassay of pregnanediol concentrations in early morning urine specimens for assessment of luteal function in women. Fertil Steril 37: 361-366, 1982.
8) Samarajeewa P, et al: The radioimmunoassay of pregnanediol-3 α -glucuronide. J Steroid Biochem 11: 1165-1171, 1979.
9) Fabres C, et al: Validation of the dual analyte assay of the estrone: pregnanediol ratio in monitoring ovarian function. Hum Reprod 8: 208-210, 1993.
10) Sauer MV, et al: Rapid measurement of urinary pregnanediol to diagnose ectopic pregnancy. Am J Obstet Gynecol 159: 153-155, 1988.
11) Mendizabal AF, et al: Hormonal monitoring of early pregnancy by a direct radioimmunoassay of steroid glucuronides in first morning urine. Fertil Steril 42: 737-740, 1984.