

マイクロプレートを用いた雄シバヤギ血漿中 5 α -ジヒドロテストステロンの酵素免疫測定法

金子悦史*・門司恭典**・桑山岳人**・神戸川明***・百目鬼郁男**

(平成14年5月30日受付/平成14年9月25日受理)

要約: 雄シバヤギ血漿中5 α -ジヒドロテストステロン(5 α -DHT)に関する酵素免疫測定法(EIA)について検討した。抗血清は抗5 α -DHT-11 α -Succinate-BSAを、酵素標識ホルモンには5 α -DHT-11 α -Succinate-peroxidase(5 α -DHT-HRP)を用いた。抗血清は100,000倍に希釈・使用が可能であった。また、抗血清にはテストステロンが30%交叉反応するため、Bond Elut CN-Uを用いたカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、被検血漿中の5 α -DHTとテストステロンを分離・測定した。その結果、酢酸エチル:ベンゼン=2:98の展開液を流したところ、1.00-4.25 mlの範囲に5 α -DHTが溶出された。添加回収試験において添加量0.1-1.0 pgの各濃度での回収率は、平均100.45% \pm 2.13となった。再現性試験における頸静脈血および精巣静脈血の測定内変動係数(n=6)は各々6.38%および5.94%となり、測定間変動係数は8.36%ならびに11.53%となった。以上の結果から、雄シバヤギの血漿中5 α -DHT濃度を、本法を用いて測定することが可能であることを明らかにした。

キーワード: 5 α -DHT, シバヤギ, エンザイムイムノアッセイ

1. 緒 言

哺乳動物において、アンドロジェンの中でもテストステロンは、主に精巣内に存在するライディヒ細胞において生成され、精子形成や雄性機能の維持、性欲の発現作用などを促す。また血中に最も多く見られるテストステロンは分泌器官の精巣では一種のプレホルモンとして存在し、血中へ放出され、標的器官にて5 α -リダクターゼの作用によって、より活性の強い5 α -ジヒドロテストステロン(5 α -DHT)へ変換される^{1,2)}。

5 α -DHTは、胎子期における性の分化、第二性徴の発現および維持に重要な役割を担っていることが明らかにされている。また近年、環境ホルモンと言われる外因性内分泌攪乱物質の広域かつ専門的な生物学的知見を得るために、科学研究に用いられるマウス、ラット、ハムスターなどの様々な実験動物も研究の対象として取り扱われるようになってきている³⁾。しかしながら、医学的知見を得るための研究成果とは別に、ウシなどの大型家畜に代表される反芻動物に関する報告は少ない。

内分泌学的な造精機能検査における血中テストステロン濃度の測定は欠かせない方法の一つである。上記ホルモンは、標的細胞において代謝されてから細胞外へ放出され、血中に見いだされる5 α -DHTの大部分は肝臓でのテストステロンから変換されたものである⁴⁾。末梢血中の5 α -DHT濃度測定の意義は、テストステロンよりも低いもの

とされ、その測定法の確立は、他の性ステロイドホルモン⁵⁻⁸⁾のそれに比較し、遅れている。このことから、反芻動物の5 α -DHTに関する研究報告が少ない一因となっているものと考えられる。

酵素免疫測定法(enzyme immunoassay: EIA)は、ラジオアイソトープ(Radioisotope: RI)を使用しない研究機関においてもホルモン濃度測定が可能であることから広く実施されるようになり、EIAによる5 α -DHTに関する測定系を確立することが急務とされる。

そこで本実験では、マイクロプレートを用いた5 α -DHTのEIA法を確立し、反芻家畜である雄シバヤギの血中5 α -DHT濃度を測定することを目的とした。

2. 材料および方法

1) 緩衝液

磷酸緩衝液(PBS)は磷酸1ナトリウム二水和物0.406 g, 磷酸2ナトリウム12水和物, 塩化ナトリウム8.2 gを1 lの蒸留水に溶解し、pH 7.0に調整し室温で保存した。

ウシ血清アルブミン添加PBS(1% BSA-PBS)は、BSA(Irvine Scientific, Fraction V) 10 gをPBS 1 lに溶解し、4°Cで保存した。

炭酸緩衝液は炭酸ナトリウム1.59 g, 炭酸水素ナトリウム2.93 gを蒸留水1 lに溶解し、pH 9.6に調整後、室温で保存した。

クエン酸緩衝液は0.1 M クエン酸溶液470 mlと0.1 M

* 東京農業大学大学院農学研究科畜産学専攻

** 東京農業大学農学部畜産学科

*** 神戸川研究所

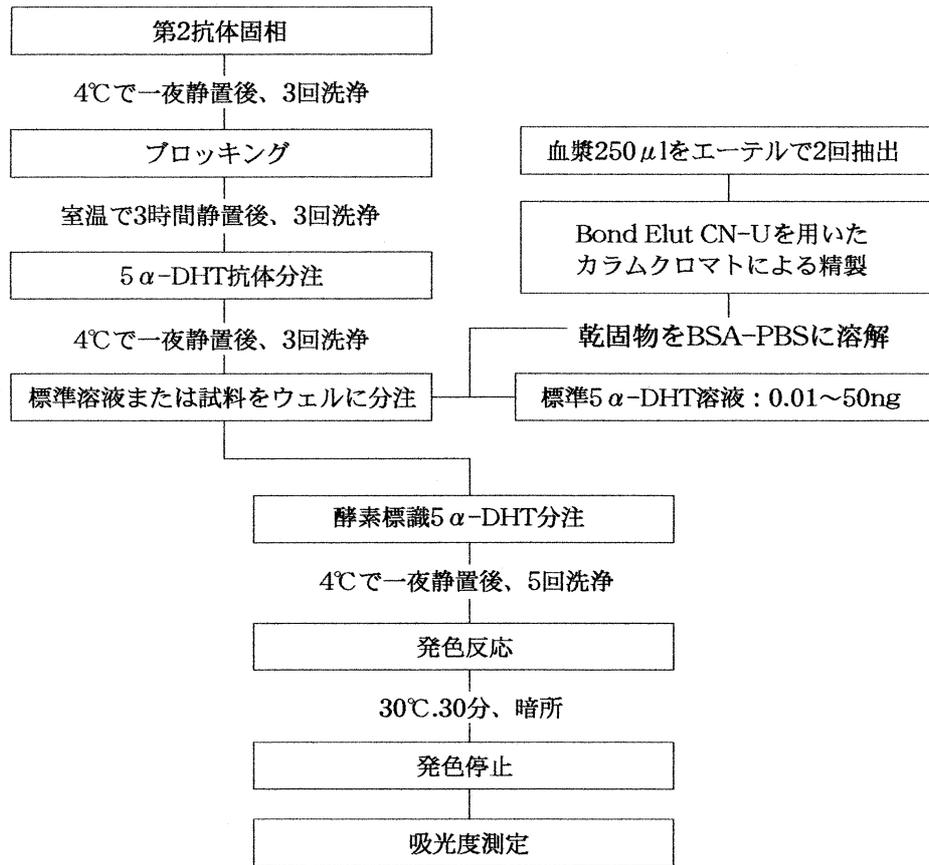


図1 雄シバヤギ血漿中 5α -DHTのEIA法操作手順

クエン酸ナトリウム溶液 530 ml とを混和して pH 4.56 に調整し、室温で保存した。

2) ステロイド

5α -DHT 純品は Sigma-Aldrich Co. 製を、酵素標識 5α -DHT はコスモバイオ製 (FKA 111) を使用した。また、 5α -DHT 純品は特級エタノールで 1 mg/ml の濃度になるよう溶解し、 -30°C で保存した。測定時に室温に戻し、1% BSA-PBS で希釈し、必要な濃度の標準液を調整した。酵素標識 5α -DHT として 5α -DHT-11-Succinate-peroxidase を用い、測定時に、1% BSA-PBS にて希釈、使用した。

3) 抗体

第一抗体には抗 5α -DHT-11 α -Succinate-BSA 抗体 (コスモ・バイオ, FKA 112) を、第二抗体として抗ウサギ、ヤギ IgG 抗体 (OEM, G5-RG15) を、使用時に各々 1% BSA-PBS、炭酸緩衝液にて必要な倍率に希釈した。

4) その他の試薬および器具

免疫実験用ブロッキング剤 (ブロックエース, 大日本製薬) は、脱イオン水にて 4 倍希釈後使用した。洗浄液には 1 l の PBS に 0.05% Tween80 添加 PBS を用い、室温で保存・使用した。酵素の基質には、O-phenylene-diamine-dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich Co.) を、クエン酸緩衝液にて 1 mg/ml に溶解・調整して -30°C で凍結保

存した。測定時に保存された OPD を融解し、クエン酸緩衝液にて 10 倍希釈したものに 0.012% の割合で過酸化水素水 (三菱瓦斯化学) を加え使用した。なお、発色停止液には 3N 硫酸溶液を用いた。マイクロプレートは 96 穴プレート (Corning, costar 9018) を、Immuno Wash (BIORAD, MODEL 1575) にて洗浄・使用した。吸光度の測定にはコロナマイクロプレートリーダー、MTP120 (コロナ電気) を用いて測定した。

5) 5α -DHT の抽出と精製

被検血漿 0.5 ml を試験管 (15×100 mm) にとり、これに 2 ml のジエチルエーテルを添加、混合した。その後、 -70°C のドライアイスにより、血漿層を凍結させ、エーテル層を他の試験管に移し 50°C ウォーターバスにて蒸発乾固させた。また、この手順を再度行い、計 2 回の操作から得られた乾固物にベンゼン 1 ml を加え融解し、カラムクロマト用試料とした。

カラムクロマトは、ベンゼン 10 ml を流し膨潤させた Bond Elut CN-U (Varian : Lot No. 132772) を用い、酢酸エチル : ベンゼン = 2 : 98 にて溶出させた上記抽出物を小試験管 (10×90 mm) に分取した。なお、溶出試験では、雄シバヤギ血漿 1 ml に、 5α -DHT 純製品およびテストステロン純品、各々 10 ng を添加したものをを用い検討した。

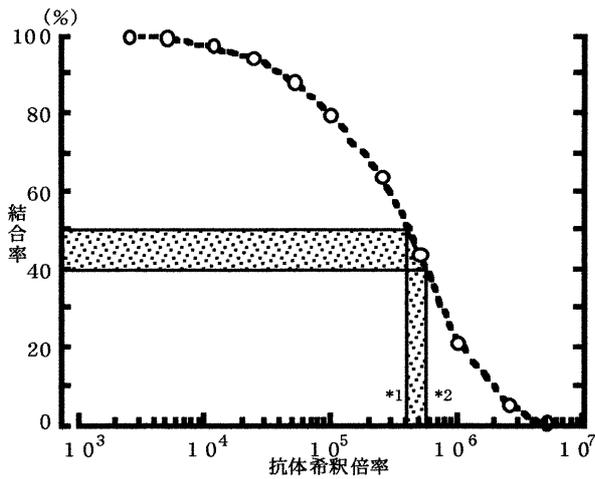


図 2 抗 5 α -DHT 抗体の力価曲線

- *1 希釈倍率: $\times 400,000$
- *2 希釈倍率: $\times 560,000$

6) 5 α -DHT の測定方法

マイクロプレートのウェル内に適正な倍率に希釈した第二抗体 50 μ l を分注し、4 $^{\circ}$ C で一夜静置、ウェルの管壁に第二抗体を吸着させた。緩衝液にて 3 回洗浄後ブロッキング剤 0.3ml を分注し、室温にて 3 時間放置後再び 3 回洗浄、抗 5 α -DHT 抗体 50 μ l を分注した。その後一夜静置したプレートを 3 回洗浄し、5 α -DHT 標準液および抽出・精製した検体、5 α -DHT-11-Succinate-peroxidase (5 α -DHT-HRP) を各々 50 μ l ずつ添加、再び一夜静置した。5 回の洗浄により、抗体と結合していない遊離型の 5 α -DHT-HRP を分離し、OPD 溶液 50 μ l を分注した。発色反応は 38 $^{\circ}$ C で 30 分静置し、十分に発色させた後 3N 硫酸 50 μ l を加え反応を停止した。その後 492 nm の波長にて吸光度を測定した。吸光度から 5 α -DHT-HRP の抗体との結合率を求め、得られた標準曲線より 5 α -DHT 濃度を算出した (図 1)。

7) 5 α -DHT の添加回収試験

雄シバヤギ血漿 1 ml に 0.1 ng, 0.25 ng, 0.5 ng, 1.0 ng の 5 α -DHT 純品を添加したものをを用い、血漿中 5 α -DHT 濃度を測定し、その回収率を求めた。

8) 再現性試験

雄シバヤギ頸静脈および精索静脈より採取、分離した血漿を用い、各血漿中 5 α -DHT 濃度を反復測定し、得られた測定値より再現性を調べた。

3. 結 果

1) 抗血清の力価

抗血清の力価を Joyce ら⁹⁾ および竹之内ら⁷⁾ の方法に準じて行い測定した。その結果は図 2 のごとくであった。すなわち希釈血清に一定量の 5 α -DHT-HRP を加え抗体との結合がほぼ飽和状態となる希釈倍率での結合率を便宜的に 100% とし、相対結合率 40-50% の範囲を適正希釈倍率とした。その結果、抗血清の適正希釈倍率は、400,000-

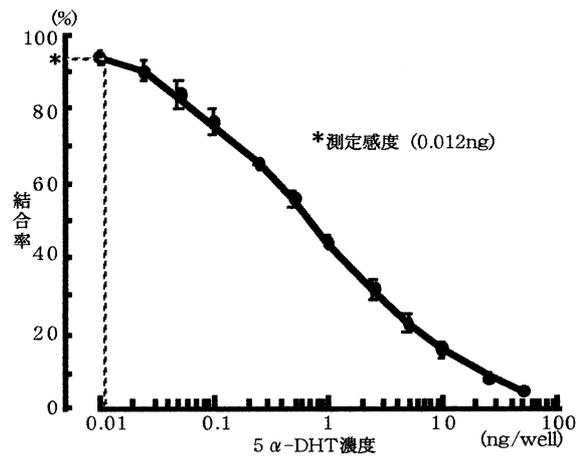


図 3 EIA による 5 α -DHT の標準曲線 (N=6)

560,000 倍であった。しかしながら、上記希釈倍率では吸光度が 0.25 程度と低かったことから、本 EIA における抗体の希釈倍率を 100,000 倍とした。

2) 標準曲線

EIA による標準曲線を図 3 に示した。横軸には標準液濃度を、縦軸は 5 α -DHT 濃度 0 ng の吸光度に対する相対結合率を示した。各濃度における結合率の変動係数 (n=6) は 2.32-11.67% であった。測定感度は 0 ng における平均吸光度から、その測定値の標準偏差の 2 倍の値を差し引いた吸光度に値する濃度を求めた。その結果 0.012 ng/well であった。以上のことから、本方法における標準曲線による測定可能範囲は 0.01 ng-50 ng であった。

3) 回収率

雄シバヤギ血漿に一定量の 5 α -DHT 純品を加え、その回収率を表 1 に示した。全測定を通じて血漿中 5 α -DHT の回収率は 99.36-103.36% であり、平均 100.45 \pm 2.13%、変動係数は 8.30 となった。

4) 再現性試験

測定内変動係数 (N=6) は雄シバヤギ頸静脈血漿では 6.38% (平均 \pm 標準偏差: 0.15 \pm 0.01 ng/ml)、精索静脈血漿では 5.94% (平均 \pm 標準偏差: 50.30 \pm 2.99 ng/ml) であった。測定間変動係数は、頸静脈血漿では 8.36% (平均 \pm 標準偏差: 0.14 \pm 0.01 ng/ml)、精索静脈血漿では 11.53% (平均 \pm 標準偏差: 53.46 \pm 6.16 ng/ml) であった。

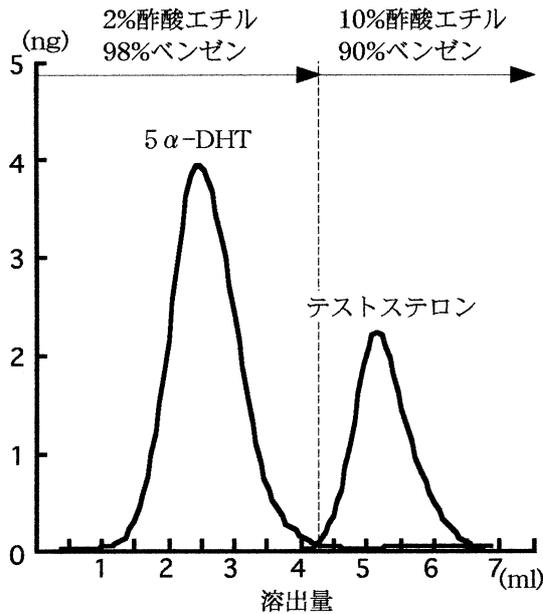
5) 5 α -DHT およびテストステロンの分離精製

試料中の 5 α -DHT を、2% 酢酸エチル-99% ベンゼンにて溶出させたところ溶出液 1.00-4.25 ml の範囲に 5 α -DHT を分取し得た (図 4)。しかしながら、テストステロンは上記溶媒では大量な液量を要する結果となった。そこで、酢酸エチルの割合を増やし、2% 酢酸エチル-99% ベンゼンで溶出させたところ、溶出液 4.25-6.50 ml の範囲にテストステロンを溶出・分取した。

表 1 5 α -DHT における EIA の測定精度

試料	5 α -DHT添加量(pg)	平均±標準偏差 (pg/試料)	回収率(%)	変動係数(%)
2ml シバヤギ血漿	0	640±26	-	4.55
	100	739±39	100.60	5.25
	250	891±83	99.36	9.35
	500	1132±14	98.48	12.50
	1000	1673±16	103.36	9.86

(n=6)

図 4 5 α -DHT およびテストステロンの分離精製

4. 考 察

本実験において、抗 5 α -DHT 抗体の適正希釈倍率を検討した結果、適正希釈倍率は 400,000-560,000 倍であった。また、この希釈倍率の範囲内、400,000 倍希釈の抗体で測定した場合、5 α -DHT-HRP の希釈倍率は数百-数千倍という濃度で十分な吸光度が得られた。しかし本法において、抗 5 α -DHT 抗体よりも 5 α -DHT-HRP は使用量が高むことを考慮し、希釈倍率を 10,000 倍以上にする必要があると考えられる。また、仮に 5 α -DHT-HRP を 10,000 倍希釈で測定すると、抗体との結合がほぼ飽和状態となる希釈倍率の便宜的な 100% となる吸光度は、1.0 程度と低く、適正とされる 40-50% の結合率であると、EIA には不十分な吸光度である。これらのことから、本実験では抗 5 α -DHT 抗体の希釈倍率を 100,000 倍と少し高濃度に設定した。また、5 α -DHT-HRP を 20,000 倍に希釈した結果、EIA に必要な 5 α -DHT 0 ng の吸光度も 0.6 程度に上昇し、より細かく、正確な測定値を見い出すことが可能となった。

添加回収試験において、雄シバヤギ被検血漿への 5 α -DHT 添加量を 100-1000 pg の範囲で増やしても、その回収率はどれも 100.45±2.13% で良好な結果であった。しか

表 2 抗 5 α -DHT 抗体における各種ステロイドの交叉反応

ステロイド	交叉反応(%)
5 α - Dihydrotestosterone(DHT)	100
Testosterone (T)	30
4 - Androstenedione	1
5 - Androstane - 3 β ,17 β - diol	0.25
5 α - Androstane - 3 α ,17 β - diol	0.20
5 β - Androstane - 3 α ,17 β - diol	0.07
Cortizol	0.01
Corticosterone	0.01
Progesterone	0.03
Pregnenolone	<0.01
17 α - Hydroxypregnenolone	<0.01
Aldosterone	<0.01
Dihydroepiandrosterone	<0.01

しながら変動係数は、濃度が高くなるにつれ大きくなる傾向が見られた。また、再現性試験において、測定内および測定間の何れも添加回収試験と同様に、高濃度である精巢静脈血中 5 α -DHT 濃度は 10% 前後と、頸静脈血に比較して高い変動係数であった。これらのことから、検体の測定は duplicate もしくは triplet assay にするべきであると考えられた。

テストステロンと DHT にそれぞれに対する特異性の高い抗体が作られつつあるが、5 α -DHT 濃度を測定するためには、依然としてテストステロンの抗 5 α -DHT 抗体に対する高い結合率・交叉率が問題となり、直接法による測定には問題が残る⁴⁾。今回使用している抗 5 α -DHT-11 α -BSA 抗体に関しても、テストステロンが 30% の交叉反応を示すためにカラムクロマトグラフィーによる精製が必要であった(表 2)。従来おこなわれている Sephadex LH-20 のマイクロカラムを用いた分離方法^{10,11)}では展開液として使用する有機溶媒の液量が多いこと、それにより抽出した溶媒を気化・乾固する時間がかかることなどから、本実験では、Bond Elut CN-U を使用した。その結果、確実に 5 α -DHT とテストステロンとを分離することが可能であった。しかしながら、Bond Elut CN-U は複数回の使用には不向きであり、多数の検体を扱う動物実験の場合にはコストの面で問題が残る。

5 α -DHT は、先にも述べたとおり標的器官での濃度はテストステロン以上に血中濃度に反映されない。木下ら

(1977) は、ヒトの末梢血中と、精巣組織中におけるテストステロンの存在意義は自ずと異なるものと述べ、同氏らは精巣組織中のテストステロン濃度をRIAにより直接測定している¹²⁾。しかしながら、本実験において確立された 5α -DHTの測定法は、標的器官の組織中における 5α -DHT濃度の測定にも活用できると考えられた。

以上のことより、シバヤギの血中 5α -DHT濃度を本EIAを用いて測定することが可能であることを明かにした。また、本方法は雄家畜における繁殖分野の研究に際して、その利用価値も高いものと考えられた。

謝辞： 5α -DHT測定に御協力していただいた神戸川研究所に深甚なる謝意を表します。また、ご助言くださった帝国臓器株式会社研究本部特別主任研究員本間誠次郎氏に深意を表します。

参考文献

- 1) 石坂和博・大島博幸, 1998. 性腺・胎盤: テストステロンとジヒドロテストステロン. ホルモンと臨床, 46, 増刊号, 333-339.
- 2) 野口和美, 1995. 臨床医学の進歩ABC. 生殖細胞シリーズ5. Leydig細胞の機能. 臨床科学, 31, 593-599.
- 3) 眞鍋昇・宮本元, 1998. 特集食品および環境生態系における内分泌攪乱物質. 畜産領域における内分泌攪乱物質. ホルモンと臨床, 46 (7), 555-562.
- 4) 山中英寿・湯浅久子・小野芳啓・福村幸仁, 1994. テストステロン. DHT. 臨床検査, 38 (11), 180-181.
- 5) 谷中匡, 1988. Progesterone, Testosterone 測定による牛の早期妊娠診断と造精機能検査法. 家畜繁殖誌, 34 (5), 56-51.
- 6) 竹之内直樹・居在家義昭・大島一修・島田和宏・高橋政義, 1993. 別冊 牛血漿中プロジェステロンの酵素免疫測定法. 中国農試研報, 12, 125-132.
- 7) 竹之内直樹・大島一修・島田和宏・高橋政義, 1997. マイクロプレートを用いた牛血漿中エストラジオール- 17β の酵素免疫測定法. J. Reprod. Dev., 43 (5), j9-j14.
- 8) 伊東貞三, 1985. IV. 内分泌学的検査E. 性腺・胎盤関係. 5α -ジヒドロテストステロン (DHT), 日本臨床, 43, 秋季臨時増刊号, 928-931.
- 9) JOYCE, B.G., READ, G.F. and FATMY, D.R., 1977. A specific enzymeimmunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids*, 29, 761-770.
- 10) 穂坂正彦・今野稔・間宮紀治・西村隆一・牧野拓雄, 1972. 血中DihydrotestosteroneのRadioimmunoassay (第1報). 日内分泌会誌, 49, 1391-1393.
- 11) 牧野拓雄・稲富顕二・吉田孝雄・田根 培・高木繁夫・神戸川明, 1973. 性ステロイドホルモンのRadioimmunoassay (その4). TestosteroneのRadioimmunoassay. ホルモンと臨床, 21, 867-873.
- 12) 木下裕三・穂坂正彦・西村隆一・高井修道, 1977. Radioimmunoassayによる睾丸組織中Testosterone濃度の測定. ホルモンと臨床, 25, 1039-1045.

Microtitre Plate Enzyme-immunoassay for Determination of 5α -Dihydrotestosterone in Shiba-goat Blood Plasma

By

Etsushi KANEKO*, Yasunori MONJI**, Takehito KUWAYAMA**,
Akira KAMBEGAWA*** and Ikuo DOMEKI**

(Received May 30, 2002/Accepted September 25, 2002)

Summary : Enzymeimmunoassay (EIA) for 5α -dihydrotestosterone (5α -DHT) in male Shiba-goat blood plasma was examined. The antiserum used 5α -DHT- 11α -succinate-peroxidase (5α -DHT-HRP) for the enzyme labeling hormone in respect of 5α -DHT- 11α -succinate-BSA. The use was possible for the antiserum at 100,000 times. The 5α -DHT in plasma was purified and separated from the testosterone by column chromatography using Bond Elut CN-U, since antiserum for 5α -DHT had cross reaction (30%) to the testosterone. The 5α -DHT was washed away by the development liquid of ethyl acetate: benzene=2 : 98 and was collected in the range between 1.00 and 4.25 ml. Recovery rates of 5α -DHT each concentration of the addition 0.1~1 ng to Shiba-goat plasma were $100.45\% \pm 2.13$ of the averages. Inter-assay coefficient of variation (C.V.) became respectively 6.38% and 5.94% in jugular and testicular vein blood, while for intra-assay, they became 8.36% and 11.53%. It was possible to analyse 5α -DHT concentration in blood plasma of the male Shiba-goat from the above result using this method.

Key Words : 5α -DHT, Shiba-goat, Enzyme-immunoassay

* Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Kambegawa Laboratory