

マイクロプレートを用いた雄シバヤギ 血漿中テストステロンの酵素免疫測定法の検討

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 11 月 26 日受付/平成 15 年 3 月 12 日受理)

要約: Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-BSA を抗原として作成した抗体, ならびに酵素標識ホルモンとして Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-peroxidase を使用し, 雄シバヤギにおける血漿中テストステロン濃度の酵素免疫測定法 (EIA) を検討した。本実験では高い測定感度が得られる二抗体法を用い, 作成した抗血清は, 350,000 倍に希釈しても使用可能な高い力価を有していた。血漿に 10~100 pg のテストステロンを添加した添加回収試験では, 回収率が平均 $102.8 \pm 2.8\%$ となった。測定内変動係数 (N=6) は雄シバヤギ頸静脈血漿で 5.08%, 精索静脈血漿では 7.32%, 測定間変動係数 (N=6) は, 頸静脈血漿で 5.74%, 精索静脈血漿で 6.13% であった。以上の結果から, 本方法によって雄シバヤギ血漿中テストステロンの測定が可能となった。

キーワード: テストステロン, シバヤギ, エンザイムイムノアッセイ

緒 言

家畜繁殖の研究には血液中のホルモン濃度の測定が必要不可欠であり, その測定には現在, 放射免疫測定法 (Radioimmunoassay: RIA) に加え, 酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay: EIA) が開発され, 研究および臨床領域で応用されつつある。雄性動物においては, 血中テストステロン濃度の測定が生殖機能の基本的な検査法とされている。テストステロンは, 主に精巣内のライディヒ細胞において生成され, 精子形成や, 性欲の発現などの雄性機能の維持, 作用を促す¹⁾。これら生理的現象の推移を内分泌学的に裏付けるものとして, 上記ホルモン濃度の測定が重視される。

畜産学分野においては, 今日に至るまで雄家畜を対象とした EIA による本ホルモンの測定の報告は少なく²⁾, RIA によるものが多い^{3,4)}。また, RIA は放射性同位元素を使用するための特別な施設, 設備が必要とされるためホルモン濃度の測定は一般の試験機関においては実施が困難である。また, テストステロンの EIA キットはいくつか市販されているものの, 感度, 精度などの点で必ずしも満足し得るものではない。また, 多数の検体を扱う場合の経費などの面で問題があるものと考えられている。

雄家畜, 特に種雄牛は, 集約化して, 飼養され頭数も非常に少なく, 一頭あたりの価値はきわめて高いものである。種雄牛が生殖に関わる疾病に罹患した場合, テストステロン濃度測定による診断, 治療およびその経過の観察は必要不可欠なものであるが, 先に述べたとおり本ホルモンの

測定は限られた施設でなければできないのが現状である。また, 雄畜の生殖内分泌学的研究は, 雌畜のそれに比べ非常に少なく, 患者に対しての適切な処置ができず, 貴重な種雄牛を廃用せざるを得なくなる件数が多い。これらの状況を踏まえ, より簡便なテストステロンの測定法を開発することが急務とされる。

そこで我々は, 前報にて報告した 5α -DHT の測定法に続き, 自主製作した抗 Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-BSA 抗体により, 標識ホルモンとして Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-peroxidase を用いたテストステロンの EIA 法で, ウシの代替動物として実験に広く供用されている雄シバヤギの血漿中テストステロン濃度を, 高精度かつ簡易に測定する系を確立することを目的とした。

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 2.65 g, 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。

* 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

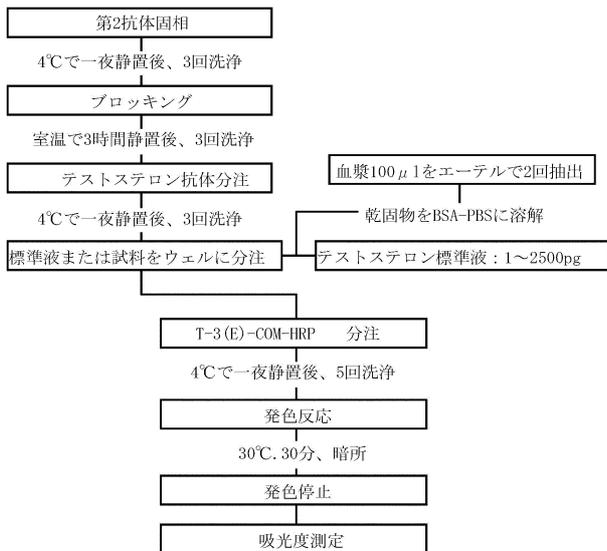


図1 雄シバヤギ血漿テストステロンのEIA操作手順

クエン酸緩衝液は0.1Mクエン酸溶液470 mlと0.1Mクエン酸ナトリウム溶液530 mlとを混和してpH 4.5に調整し、室温で保存した。

2) ステロイド

テストステロン (Sigma-Aldrich 社) は特級エタノールで0.1 mg/mlの濃度になるよう溶解し、 -30°C で保存した。測定時には室温に戻し、1% BSA-PBSで希釈し、必要な濃度の標準液を調整した。酵素標識テストステロンは神戸川の方法⁵⁾により作成した Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-peroxidase [T-3(E)-CMO-HRP]を用いた。

T-3(E)-CMO-HRPはテストステロンからT-3(E)-CMOを作り、Horse radish peroxidase (HRP)と結合させるために活性エステルであるN-hydroxysuccinimide (NHS) エステルを作製し、HRPと結合させたものをゲル濾過にて精製した。測定時には1% BSA-PBSにて希釈使用した。

3) 抗体

第一抗体には抗 Testosterone-3(E)-carboxymethyl-oxime-BSA 抗体 (anti-T) を用いた。また、抗体作成に用いる T-3(E)-CMO は神戸川の方法⁵⁾で作製し、BSAとの結合は混合酸無水物法⁷⁾で行った。作製された T-3(E)-CMO-BSA を3匹のウサギへ1/月の割合で、計5回背および趾に注射し anti-T を得た。anti-T の力価測定は竹之内ら⁸⁾および Joye ら⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち、テストステロンの希釈抗血清に T-3(E)-CMO-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。また、抗体希釈曲線および交叉反応率を測定し、最も抗体価の高いウサギ (No. 572) から得られた血清を本実験に使用し、測定時には1% BSA-PBSで適切な濃度に希釈した。第二抗体は抗ウサギ-ヤギ IgG 抗体

(OEM社)を、炭酸緩衝液にて適正な倍率に希釈して使用した。

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、Ortho-phenylene-diamine-dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich 社) 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。測定時に凍結保存された 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を加えて使用した。なお、発色停止液には3N硫酸溶液を用いた。96穴マイクロプレート (Corning, costar 9018) を、Immuno Wash (BIORAD, MODEL 1575)にて洗浄した。吸光度の測定にはコナマイクロプレートリーダー MTP120 (コナ電気)を用いた。

5) テストステロンの抽出と精製

被検血漿0.1 mlを試験管 (10×90 mm) にとり、これに1 mlのジエチルエーテルを加え攪拌・抽出した。その後、冷却器 (COOLPIPE 250DF, タイテック) により -60°C まで冷却したメタノールで血漿層を凍結させ、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燥させた。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1% BSA-PBSを0.5 ml加えて融解し、測定用試料とした。

6) テストステロンの測定手順

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100 μlを分注し、 4°C で一晩静置、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0.3 mlを分注し、室温にて3時間放置後再び3回洗浄、anti-T 100 μlを分注した。その後一夜静置したプレートを3回洗浄し、テストステロン標準液、抽出した検体および T-3(E)-CMO-HRP を各々100 μl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テストステロンを洗い流し、OPD 溶液100 μlを分注した。発色反応は 38°C で30分静置し、十分に発色させた後、3N硫酸100 μlを加え反応を停止した後492 nmの波長にて吸光度を測定した。吸光度から T-3(E)-CMO-HRP と抗体との結合率を求め、得られた標準曲線よりテストステロン濃度を算出した (図1)。

7) テストステロンの添加回収試験

1% BSA-PBS 10 μl中にテストステロンがそれぞれ10, 25, 50 および100 pg 含まれるように調整し、雄シバヤギ血漿0.1 mlに添加したものをを用い、血漿テストステロンの回収率を求めた。

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

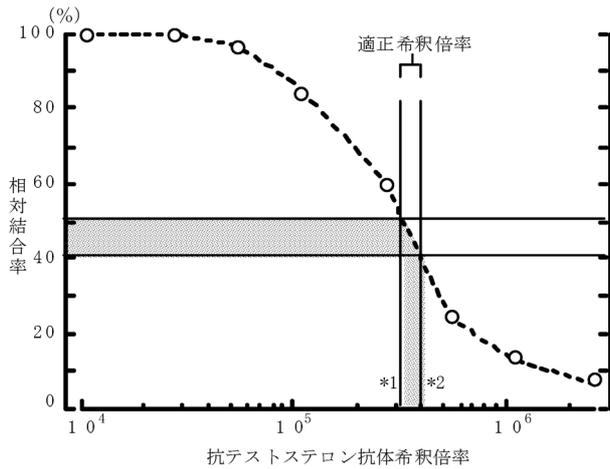


図 2 抗テストステロン抗体の力価曲線

*1 希釈倍率: ×336,000
*2 希釈倍率: ×436,000

表 1 抗テストステロン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 (%)
Testosterone (T)	100
5 α - Dihydrotestosterone(DHT)	18.3
4 - Androstenedione	0.82
Androsterone	0.28
5 - Androstane - 3 β ,17 β - diol	0.15
5 α - Androstane - 3 α ,17 β - diol	0.10
5 β - Androstane - 3 α ,17 β - diol	0.09
Cortizol	0.02
Corticosterone	0.01
Progesterone	0.01
Pregnenolone	<0.01
17 α - Hydroxypregnenolone	<0.01
Aldosterone	<0.01
Dihydroepiandrosterone	<0.01
Estradiol	<0.01

漿を用い、各血漿中テストステロン濃度を反復測定し、得られた測定値より再現性を調べた。

結 果

1) 抗血清の力価

anti-T の適正希釈倍率は 336,000. 436,000 倍であったので (図 2), 本実験では希釈倍率を, 350,000 倍とした。また, anti-T とテストステロンの結合率を 100% としたテストステロンでは 18.3% と低く, さらに他のステロイドホルモンでは 1% 以下であった (表 1)。

2) 標準曲線

EIA における標準曲線を図 3 に示した。横軸にはテストステロン標準液濃度を, 縦軸には T 濃度 0 pg の吸光度に対する相対結合率を表した。各濃度における結合率の変動係数 (n=6) は 2.33. 10.77% であった。測定感度は, 反復測定した 0 pg の平均吸光度における標準偏差の 2 倍の値を差し引いた吸光度に値する濃度から求めた。その結果, 0.068 pg/well (1 pg 以下) となり, 本 EIA に用いる標準曲線の範囲は, 1 pg. 2,500 pg とした。

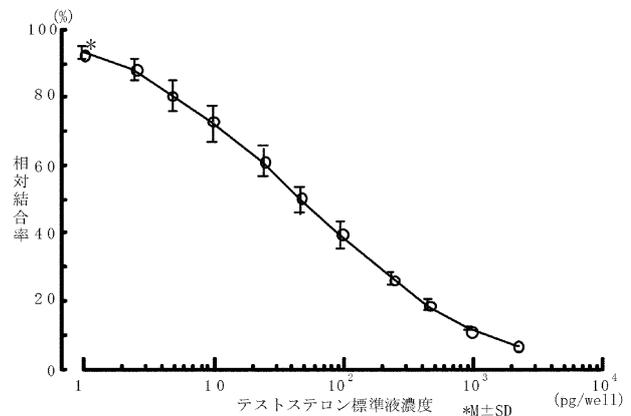


図 3 EIA によるテストステロンの標準曲線 (N=6)

表 2 テストステロンにおける EIA の測定精度

試料	テストステロン添加量 (pg)	平均±標準偏差 (pg/試料)	回収率 (%)	変動係数 (%)
シバヤギ血漿	0	213±10	-	4.84
	10	229±11	99.0	4.85
	25	239±05	103.2	2.07
	50	265±14	103.4	5.35
	100	319±12	105.6	3.63

(N=6)

3) 回収率

血漿に一定量の T を加え、その回収率を検討した成績を表 2 に示した。全測定を通じて、血漿中 T の回収率は 99.0、105.6%、平均 $102.8 \pm 2.8\%$ であった。

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 5.08%、(テストステロン濃度、平均±標準偏差: 1.79 ± 0.09 ng/ml)、精索静脈血漿では 7.32% (369.58 ± 27.04 ng/ml) であった。測定間変動係数においては、頸静脈血漿で 5.74% (1.74 ± 0.10 ng/ml)、精索静脈血漿では 6.13% (366.24 ± 22.45 ng/ml) を示した。

考 察

anti-T の適正希釈倍率を検討した結果、本 EIA では抗血清を 350,000 倍に希釈・使用することが可能であった。EIA においてテストステロンのみならず、B/F 分離をする際に、その方法は、固相法と二抗体法に大別される。操作手順が簡便な固相法を用いた SAMANTA *et al.*¹⁰⁾ の方法に対し、本実験では高い測定感度が得られる二抗体法を用い、高力価の抗体を使用したことから、抗体の希釈倍率を大幅に上げることが可能であった。また、著者らが確立した本測定法は、測定範囲が他の EIA の報告^{10,11)} に比較し、標準曲線を広範囲、かつ低濃度まで描けたことに加え、添加ホルモンの回収実験においても、回収率が平均 102.8%、(変動係数: 平均 4.15%) であったことから、本測定法の精度は高いと考えられた。

測定内変動係数および測定間変動係数は、何れも 10% 以内であった。このことは、ヒト血清を用いて行った JOSHI *et al.*¹¹⁾、ならびに本実験同様マイクロプレートを用いた SAMANTA *et al.*¹⁰⁾ の方法と同等またはそれ以上の精度が得られたと言える。

シバヤギは小型で扱い易く、比較的血液等の採材を頻繁に行うことが容易であり、継続的に血液採取を行う実験では多量の検体数を一度に、あるいは反復して測定することも可能であり、実験動物として極めて有利である。

谷中ら²⁾ は雄ウシの血中テストステロンを固相法による EIA で測定し、その測定範囲は 21~4,000 pg であったとしているが、それに対し本方法における測定範囲は 1~2,500 pg であった。また、本 EIA は添加ホルモンの回収実験ならびに再現性試験の結果から、信頼性は高く、テストステロン濃度測定を臨床繁殖の研究に用いる場合においても、有意義なものであると考えられた。

本実験に使用した試料は雄シバヤギ血漿であったが、本 EIA は精巢バイオプシーなどにより得られた僅かな精巢組織をホルモン濃度測定に供試する場合や、雄のみならず健全な雌家畜を対象としたテストステロンの研究への応用も可能であると考えられた。

本実験に用いた抗体はテストステロンとの反応力価を

100% とした場合、5 α -DHT に対して 18.3% の比較的低い交叉率を示した (表 2)。末梢静脈血のテストステロン濃度測定に関しては 5 α -DHT 濃度が通常きわめて低いことから、これを除去するためにはエーテルによる抽出のみの操作で十分であるものと考えられる。しかしながら、ホルモン分泌異常などに由来する疾病の臨床検査、あるいは 5 α -DHT の分泌母地である精巢や副生殖腺等の組織中テストステロン濃度を測定する場合は、クロマトグラフィーによるテストステロンと 5 α -DHT の分画精製が必要であるものと考えられる。

以上の結果から、本 EIA の反応系は、高い測定感度および精度を有することから、雄シバヤギの血漿中テストステロン濃度の測定のみならず、広く繁殖分野の研究および臨床検査に応用しうることが示唆された。

謝辞: 本研究に関し、御意見、御指導をいただいた帝國臓器メディカル株式会社、牧野拓雄博士ならびに本間誠次郎博士に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) 石坂和博・大島博幸, 1998. V. 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) 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), 45-51.
- 3) KAWAKAMI, E., AMEMIYA, E., NAMIKAWA, K., KASHIWAGI, C., HORI, T. and TSUTSUI, T., 2001. High plasma Estradiol-17 β Levels in Dogs with Benign Prostatic hyperplasia and Azoospermia. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 407-412.
- 4) TANI, M., SAWADA, T., ISHIGAMI, T., KISHIMOTO, M. and MORI, J., 1992. Androstenedione and Testosterone levels in peripheral plasma of male shiba goats during development. *J. Reprod. Dev.*, 38, 235-238.
- 5) 金子悦史・門司恭典・桑山岳人・神戸川明・百目鬼郁男, 2002. 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. 東京農大農学集報, 47, 187-192.
- 6) 神戸川明, 1995. エンザイムイムノアッセイにおける酵素標識法の種類とその特性. 日本臨床, 54, 2160-2167.
- 7) MITSUMA, M. and KAMBEGAWA, A., 1989. A sensitive bridge heterologous enzymeimmunoassay of progesterone using geometrical isomers. *J. Steroid. Biochem.*, 32, 467-471.
- 8) 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-17 β の酵素免疫測定法. *J. Reprod. Dev.*, 43 (5), j9-j14.
- 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) SAMANTA, A.K. and ALI, E., 1990. Enzyme immunoassay of testosterone using nitrocellulose discs as the solid phase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 29, 761-770.
- 11) JOSHI, U.M., SHAH, H.P. and SUDHAMA, S.P., 1979. A sensitive and specific enzymeimmunoassay for serum testosterone. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 29, 761-770.

Microtitre Plate Enzyme-immunoassay for Determination of Testosterone in Shiba-goat Blood Plasma

By

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

(Received November 26, 2002/Accepted March 12, 2003)

Summary : Enzymeimmunoassay (EIA) of testosterone was examined in which an individual antibody, and testosterone-peroxidase-conjugate were used for that, was measured in male Shiba-goat plasma. An anti-testosterone-3(E)-carboxymethyloxime-BSA antibody was used as an anti-serum, and testosterone-3(E)-carboxymethyloxime-peroxidase was used as a steroid-enzyme conjugate. The anti-serum was diluted by using 2nd antibody method which could get high measurement sensitivity of 350,000 times. Recovery rates of testosterone for each concentration with the addition of 10~100 pg to Shiba-goat plasma were $102.8 \pm 2.8\%$ of the averages. Inter-assay coefficient of variation (C.V.) for testosterone level from jugular and testicular vein blood plasma samples were 5.08% and 7.32% respectively, as for intra-assay, they became 5.74% and 6.13%. These results suggest that the EIA method is extremely suitable to measure testosterone concentration in blood plasma of the male Shiba-goat.

Key Words : testosterone, Shiba-goat, Enzymeimmunoassay

* 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